

8

ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

4 - 7 Haziran 2014

Swiss Otel, Ankara



ANKARA MİKROBİYOLOJİ
DERNEĞİ



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DESTEKLEYEN KURULUŞLAR



GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



Güncel Kongre Bilgisine
Cep Telefonunuz Kadar
YAKINSINIZ!
Cep telefonunuzun tarayıcısına
<http://gettag.mobi>
yazın. Ücretsiz yazılımı indirin!

PROGRAM VE BİLDİRİ ÖZET KİTABI

8. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

4-7 Haziran 2014
Swissôtel, Ankara

PROGRAM VE BİLDİRİ ÖZET KİTABI

Editör
Prof. Dr. Dürdal US



1881 - ∞
"Bilim, gerçeği bilmektir."

K. Atatürk

BİLİMSEL SEKRETERYA



Prof. Dr. Banu Sancak
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
06100 Sıhhiye / Ankara
Tel: +90 312 305 15 62
e-posta: banusancak@yahoo.com



Yrd. Doç. Dr. H. Kaan Müştak
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
06110 Dışkapı / Ankara
Tel: +90 312 317 03 15
e-posta: kaanmustak@gmail.com

KONGRE SEKRETERYASI



SERENAS Uluslararası Turizm Kongre Organizasyon A.Ş.
Hilal Mahallesi, Cezayir Cad. No:13, 06550
Yıldız, Çankaya - ANKARA / TÜRKİYE
Tel : +90 312 440 50 11
Fax : +90 312 441 45 64

YAYIN HİZMETLERİ



BAYT Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım Ltd. Şti.
Ziya Gökalp Cad. 30/31, Kızılay, Ankara
Tel : 0 312 431 30 62
Faks: 0 312 431 36 02
E-mail : info@bayt.com.tr

İÇİNDEKİLER

Kurullar	V
Genel Bilgiler	VI
Kurs Programı	VIII
Kongre Programı	IX
KONFERANSLAR	1
1. Genleri değiştirmek hiç bu kadar kolay olmamiştı	2
2. Nötrofil tuzağı	4
3. Mikrobiyolojik tanıda eski sorunlar ve yeni yaklaşımlar	6
5. İmmün sistemin yaşlanması ve aşılara yanıtı	8
MİNİ KONFERANS	
Mantar-konak ilişkisinin şekillenmesinde moleküler genetik yaklaşımlar	13
PANELLER	15
1. Mikrobiyota: Dost mu, dūřman mı?	16
2. Moleküler testlerin kullanımında kalite nasıl sağlanır ve izlenir?	25
3. Transplant hastalarında CMV ve BKV enfeksiyonlarının moleküler ve immünolojik izlemi	31
4. Antibiyotik direnci saptamada yenilikler	38
5. Mikolojik tanı ve tanımlamada güncel yaklaşımlar	44
6. Tüberkülozda yenilikler	51
7. Veteriner hekimlik alanında moleküler testlerin kullanımı	58
8. Viral gastroenteritler	62
9. İmmün süpresif hastalar için önem taşıyan bazı etkenlerin mikrobiyolojik tanısı	69
Yuvarlak masa (interaktif): Tanısal mikrobiyolojide hızlı/hasta başı testleri: değeri ve uygulanabilirliği ...	78
SÖZEL BİLDİRİLER	85
POSTER BİLDİRİLER	90
YAZAR İNDEKSİ	147
KONGREYE DESTEK VEREN KURULUşLAR	152

KURULLAR

DÜZENLEME KURULU

Onursal Başkan

Ayfer GÜNALP

Başkan

Gülşen HASÇELİK

Başkan Yardımcısı

Dürdal US

Kongre Sekreterleri

Özgen Eser

Meltem Yalınay Çırak

Banu Sancak

H. Kaan Müştak

Üyeler

Cumhur Özkuyumcu

Burçin Şener

Serdar Diker

Gülendam Bozdayı

Koray Ergünay

Zeynep Sarıbaş

Dolunay Gülmez Kıvanç

Aslı Çakar

Birsel Erdem

Alper Ergin

BİLİMSEL KURUL *

Hakan Abacıoğlu

Yurdanur Akgün

Alpaslan Alp

Sevtap Arıkan-Akdağlı

Faruk Aydın

Fuat Aydın

Selim Badur

Bülent Bozdoğan

Burhan Çetinkaya

Rıza Durmaz

Birsel Erdem

Selda Erensoy

Sibel Ergüven

Berrin Esen

Meral Gültekin

Ayşe Kalkancı

Z. Ceren Karahan

Abdullah Kılıç

Tanıl Kocagöz

Metin Korkmaz

Kaya Köksalan

Ayhan Kubar

Canan Külah

Barış Otlu

Aykut Özkul

Ahmet Pınar

Seyyal Rota

Mehmet Ali Saraçlı

Arzu Sayıner

Rüçhan Sertöz

Güner Söyletir

Barış Sareyyüpoğlu

Mehmet Tanyüksel

Alper Tekeli

Ferda Tunçkanat

Yakut Akyön Yılmaz

*Soyadlara göre alfabetik sıra ile yazılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Kongre Öncesi Kurs ve Tarihi

“Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Kursu-Temel PCR Teknikleri ve Uygulama Alanları” 03 - 04 Haziran 2014

Kurs Merkezi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dekanlık 2. Kat Mikrobiyoloji Laboratuvarı – Beşevler, Ankara

Kongre Tarihi

04-07 Haziran 2014

Kongre Merkezi

Swissôtel Ankara

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

Tel: 0312 409 3000

Kongre Dili

Kongre resmi dili Türkçe’ dir.

Kongrenin Web Adresi

www.molekulermikro2014.org

Kredilendirme

8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Türk Tabipler Birliği “Sürekli Tıp Eğitimi (STE)” Kredilendirme Kurulu tarafından “19,5” TTB-STE kredi puanı ile kredilendirilmiştir.

Not: Kurul tarafından kredilendirilen kongremiz tıp doktorlarını kapsamaktadır.

Kongre Danışma ve Kayıt Masası Çalışma Saatleri

Kayıt ve Danışma Masası, 04 Haziran 2014 gününden itibaren saat 08.30-18.00 arası hizmet verecektir. Kayıt yaptırmamış olan katılımcılar Swissôtel Ankara’da kurulacak kongre kayıt masasında kayıtlarını yaptırabilirler.

Sergi Alanları

Sergi alanı, 04 Haziran 2014 tarihinde, saat 14.00’da açılacaktır. 05-07 Haziran 2014 tarihleri arasında, 08.30-18.30 saatleri arasında, Anatolia 1 toplantı salonunda açık olacaktır.

Yaka Kartları

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

Katılım Sertifikası

Tüm katılımcılar kongre katılım sertifikalarını **05 Haziran 2014** tarihinden itibaren kongre kayıt masasından alabileceklerdir.

Teknik Destek

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

Poster Bildiri ve Tartışmaları

Posterlerin 04 Haziran 2014 Çarşamba günü saat 14.00 – 18.00 arası asılmış olması ve kongre süresince poster alanında asılı kalması gerekmektedir. Poster tartışmaları aşağıdaki gün ve saatlerde, poster başında yapılacaktır. Poster sahibi katılımcıların, poster tartışmalarına katılmak üzere, poster alanında hazır olması önemle rica edilir.

5 Haziran 2014, Perşembe 12:30 - 13:30

Konu	Poster No
Bakteriyoloji	PP 001 – PP 052

6 Haziran 2014, Cuma 12:30 - 13:30

Konu	Poster No
Bakteriyoloji	PP 053 – PP 083
İmmünoloji	PP 084 – PP 092
Mikoloji	PP 093 – PP 099

7 Haziran 2014, Cumartesi 12:30 - 13:30

Konu	Poster No
Parazitoloji	PP 100 – PP 102
Viroloji	PP 103 – PP 143
Diğer	PP 144 – PP 147
Genel Mikrobiyoloji	PP 148 – PP 155

KURS PROGRAMI

TANISAL MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİ KURSU

TEMEL PCR TEKNİKLERİ VE UYGULAMA ALANLARI

Kurs Yeri : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dekanlık 2. Kat Mikrobiyoloji Laboratuvarı – Beşevler

3 Haziran 2014, Salı

- 09.00 - 09.15** **Kursun Tanıtımı**
Meltem YALINAY ÇIRAK
- 09.15 - 10.15** **Moleküler Yöntemlerin Mikrobiyolojide Kullanım Alanları**
Meltem YALINAY ÇIRAK
- 10.15 - 10.30** Kahve Arası
- 10.30 - 11.15** **Nükleik Asit İzolasyon Yöntemleri**
Canan KÜLAH
- 11.15 - 12.00** **PCR Yönteminin Temel Basamakları ve Temel PCR Yöntemleri**
Barış OTLU
- 12.00 - 13.00** **Öğle Yemeği**
- 13.00 - 15.00** **Uygulama: Nükleik Asit İzolasyonu**
Canan KÜLAH
Fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi
Spin-kolon yöntemi
Elde edilen nükleik asidin saflığının kontrolü
- 15.00 - 15.15** Kahve Arası
- 15.15 - 16.30** **Uygulama: In-House PCR**
Barış OTLU
PCR reaksiyonun komponentleri ve optimizasyonu
K. pneumoniae'da OXA-48 ve KPC genlerinin tespiti
- 16.30 - 18.00** **Uygulama: Amplifikasyon Ürünlerinin Görüntülenmesi**
Burçe YALÇIN
Agaroz jel elektroforez yönteminin özellikleri
TBE tamponunun hazırlanması
Agaroz jelin hazırlanması
Amplifikasyon ürünlerinin jele yüklenmesi
Elektroforez koşullarının ampikon göçüne etkisinin tartışılması

4 Haziran 2014, Çarşamba

- 09.00- 11.00** **Gerçek Zamanlı PCR Yöntemleri**
Doruk ENGİN
Florojenik boyalarla hedef DNA'nın tespiti
Melting-curve analizi
K. pneumoniae'da OXA-48 ve KPC genlerinin tespiti
Sekans-spesifik florojenik oligonükleotid prolarla bakteri DNA'sının TaqMan prob kullanılarak gösterilmesi
- 11.00 - 11.15** Kahve Arası
- 11.15 - 12.00** **PCR Uygulamalarında Karşılaşılabilecek Sorunlar**
Ceren KARAHAN
- 12.00 - 12.30** **Değerlendirme Toplantısı ve Sertifika Dağıtımı**
Meltem YALINAY ÇIRAK


KONGRE PROGRAMI

4 Haziran 2014, Çarşamba

- 14.00-14.30 Açılış
- 14.30-15.30 **Konferans 1: Genleri Değiştirmek Hiç Bu Kadar Kolay Olmamıştı**
Oturum Başkanı: Nezahat GÜRLER
Konuşmacı: Tanıl KOCAGÖZ
- 15.30-15.45 Kahve Arası
- 15.45-16.45 **Konferans 2: Nötrofil Tuzağı**
Oturum Başkanı: Faruk AYDIN
Konuşmacı: Güner SÖYLETİR
- 16.45-17.15 **Paramedikal Konferans: Bir Türk Markası: Lokum**
Belin ÇELEBİ
- 17.15-17.45 Lokum ve Kahve İkramı



5 Haziran 2014, Perşembe

- 08.30-09.00 **Sözlü Sunumlar – Viroloji**
Oturum Başkanları: Rüçhan SERTÖZ - Koray ERGÜNAY
- 09.00-10.00 **Konferans 3: Mikrobiyolojik Tanıda Eski Sorunlar ve Yeni Yaklaşımlar**
Oturum Başkanı: Dürdal US
Konuşmacı: Hakan ABACIOĞLU
- 10.00-10.30 Kahve Arası
- 10.30-12.30 **Panel 1: Mikrobiyota: Dost mu, Düşman mı?**
Oturum Başkanları: Cumhur ÖZKUYUMCU - Nedim SULTAN
- Çocuklarda İntestinal Mikrobiyota
 - Erişkinlerde Mikrobiyota
 - Mikrobiyota ve Epigenetik
 - Mikrobiyotanın En Etkili Analizi: Yeni Nesil Dizileme Sistemleri
- Ener Çağrı DİNLEYİCİ
Tarkan KARAKAN
Meltem YALINAY ÇIRAK
Barış OTLU
- 12.30-13.30 **Öğle Yemeği**
- 13.30-14.30 **Konferans 4: The Abbott Solution for Molecular Testing (Destekleyen Firma: ABBOTT)**
Oturum Başkanı: Gülşen HASÇELİK
Konuşmacı: Birgit HERZIG
- 
- 14.30-15.00 Kahve Arası
- 15.00-16.15 **Panel 2: Moleküler Testlerin Kullanımında Kalite Nasıl Sağlanır ve İzlenir?**
Oturum Başkanları: Arzu SAYINER - Ahmet PINAR
- Moleküler Testlerde Yöntem Geçerliliğinin Kanıtlanması
 - Moleküler Testlerde İç Kalite Kontrolü
 - Moleküler Testlerde Dış Kalite Kontrolü
- Arzu SAYINER
Aydan ÖZKÜTÜK
Nuran ESEN

16.15-17.30 Yuvarlak Masa (İnteraktif): Tanısal Mikrobiyolojide Hızlı-Hasta Baş Testleri: Değeri ve Uygulanabilirliği
Oturum Başkanı: Selda ERENŞOY
Konuşmacılar: Selda ERENŞOY
Rüçhan SERTÖZ
Abdullah KILIÇ

17.30-18.30 Paramedikal Konferans: Hipnoz
Konuşmacı: Alp ARDIÇ

18.30-19.30 Grup La Minör Müzik Performansı

6 Haziran 2014, Cuma

08.30-09.00 Sözlü Sunumlar - Bakterioloji
Oturum Başkanları: Deniz GÜR - Özgen ESER

09.00-10.15 Panel 3: Transplant Hastalarında CMV ve BKV Enfeksiyonlarının Moleküler ve İmmünolojik İzlemi
Oturum Başkanları: Meral GÜLTEKİN - Hakan ABACIOĞLU
• CMV Moleküler Tanısı ve İzlemi
• BKV Moleküler Tanısı ve İzlemi
• İmmünolojik İzlem

Dilek ÇOLAK
Derya MUTLU
Meral GÜLTEKİN

10.15-10.45 Kahve Arası

10.45-11.30 Konferans 5: İmmün Sistemin Yaşlanması ve Aşılarla Yanıtı
Oturum Başkanı: Dürdal US
Konuşmacı: Selim BADUR

11.30-12.30 Konferans 6: Molecular Diagnostics: The Future of Clinical Microbiology (Destekleyen Firma: BECTON DICKINSON)
Oturum Başkanı: Deniz GÜR
Konuşmacı: Patrick R. MURRAY



12.30-13.30 Öğle Yemeği

13.30-14.30 Panel 4: Antibiyotik Direnci Saptamada Yenilikler
Oturum Başkanları: Ferda TUNÇKANAT - Mehmet BAYSALLAR
• Antibiyotik Direnci Saptamada Kültüre Dayalı Yöntemler ve Dirençte Antibakteriyel Tedavi Yaklaşımları
• Antibiyotik Direnci Saptamada Moleküler Tanı Testleri

Sesin KOCAGÖZ
Özgen ESER

14.30-15.00 Kahve Arası

15.00-16:30 Panel 5: Mikolojik Tanı ve Tanımlamada Güncel Yaklaşımlar
Oturum Başkanları: Semra KUŞTİMUR - Sevtap ARIKAN AKDAĞLI
• DNA Barkodlama
• Galaktomannan ve Beta-Glukan Testleri için Klinik Örnek Seçimi: Serum mu, Başka Örnek(ler) mi?
• Mikolojide MALDI-TOF Uygulamaları

Çağrı ERGİN

Gökhan METAN
Işın AKYAR

16.30-17.00 Mini Konferans: Mantar-Konak İlişkisinin Şekillenmesinde Moleküler Genetik Yaklaşımlar
Oturum Başkanı: Gülsan SUCAK
Konuşmacı: Ayşe KALKANCI

17.00-18.00 Paramedikal Konferans: Eleştirel ve Yaratıcı Düşünme
Konuşmacı: Meltem YALINAY ÇIRAK

18.00-18.30 Serenas Çok Sesli Korosu

7 Haziran 2014, Cumartesi

08.30-09.00	Sözlü Sunumlar - Mikoloji / Parazitoloji / İmmünoloji Oturma Başkanları: Ayşe KALKANCI - Yakut AKYÖN YILMAZ	
09.00-10.15	Panel 6: Tüberkülozda Yenilikler Oturma Başkanları: Yurdanur AKGÜN - Süheyla SÜRÜCÜOĞLU • Tüberküloz Tanısında Yeni Moleküler Testler • Tüberküloz Tanısında Biyobelirteçler • İkinci Sıra İlaç Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Pekin Suşunun Türkiye'de Yaygınlığı	Cengiz ÇAVUŞOĞLU Zeynep SARIBAŞ Nuri ÖZKÜTÜK Orhan Kaya KÖKSALAN
10.15-10.45	Kahve Arası	
10.45-11.30	Panel 7: Veteriner Hekimlik Alanında Moleküler Testlerin Kullanımı Oturma Başkanları: Serdar DİKER - Banu SANCAK • Moleküler Tanı Rutin Veteriner Mikrobiyolojide Neleri Değiştirdi? • Moleküler Yöntemler Türkiye'de Kanatlılarda <i>Salmonella</i> Kontrolüne Nasıl Katkı Sağlıyor?	Serdar DİKER Mehmet AKAN
11.30-12.30	Konferans 7: Nörolojide Laboratuvar Testleri; Otoimmün Ensefalitler, Demans Hastalıkları ve Alzheimer (Destekleyen Firma: EUROIMMUN) Oturma Başkanı: Burçin ŞENER Konuşmacı: Tutku TAŞKINOĞLU	 Medizinische Labordiagnostika AG
12.30-13.30	Öğle Yemeği	
13.30-14.45	Panel 8: Viral Gastroenteritler Oturma Başkanları: Rıza DURMAZ - Murat AKSOY • Türkiye'de Rotavirusların Genotipleri: TÜROSA Verileri Işığında Aşıların Kapsayıcılığı • Viral Gastroenteritlerin Laboratuvar Tanısında Güncel Durum • Viral Gastroenteritlerin Ülkemiz ve Dünyadaki Güncel Durumu	Rıza DURMAZ Gülendam BOZDAYI Gülşay KORUKLUOĞLU
14.45-15.15	Kahve Arası	
15.15-17.15	Panel 9: İmmün Süpresif Hastalar için Önem Taşıyan Bazı Etkenlerin Mikrobiyolojik Tanısı Oturma Başkanları: Sibel ERGÜVEN - Yüksel GÜRÜZ • <i>Toxoplasma gondii</i> • <i>Pneumocystis jirovecii</i> • <i>Microsporidium</i> spp. • <i>Cryptosporidium</i> spp. • <i>Strongyloides stercoralis</i>	Yüksel GÜRÜZ Mert DÖŞKAYA Ayşe CANER Hüseyin CAN Esra ATALAY
17.15-18.00	Paramedikal Konferans: Fotoğraf Teknikleri Üzerine Sohbetler ve Yarışma Sonuçları Moderatör: Gülendam BOZDAYI Konuşmacılar: Atilla ÜNLÜEVCEK İbrahim YÜCEL Yavuz İLDİZ	Fotoğraf Sanatçısı AFSAD Fotoğraf Sanatçısı AFSAD Fotoğraf Sanatçısı AFSAD
18.00-18.30	Bildiri Ödüllerinin Verilmesi ve Kapanış Konuşmaları	

SOSYAL PROGRAM

4 Haziran 2014, Çarşamba

17.45-18.15 Lokum ve Kahve İkramı



M. Belin ÇELEBİ

İlk, orta ve lise öğreniminin ardından 2000 yılında Gazi Üniversitesi İ. İ. B. F. İşletme bölümünden mezun oldu. 2003 yılında Başkent Üniversitesi İşletme Yönetimi Yüksek Lisans Programını (MBA) tamamladı. 2003-2004 yılları arasında Ankara Üniversitesi Avrupa Toplulukları Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından verilen Avrupa Birliği Uzmanlığı ve Uluslararası İlişkiler Uzmanlığı Eğitimlerini aldı. Çeşitli reklam ajanslarında kısa süreli çalıştıktan sonra 2004 yılında Kanal B'de program yapımcısı ve sunucu olarak çalışmaya başladı. Dünya Mutfakları, Türk ve Füzyon mutfağı üzerine bir çoğu canlı olmak üzere 400'ü aşkın sayıda programın yapımcılığını ve sunuculuğunu üstlendi. Kanal B'de çalıştığı süre içerisinde eş zamanlı olarak Ankara MAG dergisinde yemek üzerine yazılar yazdı. 2009 yılında Kanal B'de ki görevinden ayrıldı. 2012 yılından itibaren serbest zamanlı olarak yapımcı ve sunuculuk yapmakta olan M. Belin ÇELEBİ, büyük ve orta ölçekli birçok organizasyonda profesyonel olarak sunuculuk yapmaktadır.

5 Haziran 2014, Perşembe

17.30-18.30 Paramedikal Konferans: Hipnoz



Psikolog ALP ARDIÇ

Ankara'da doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi Ankara Arı Koleji'nde tamamladım. Ankara Üniversitesi'nde başladığım eğitimimi Dicle Üniversitesi'nde devam ettirdim. Üniversite hayatımın ardından özel başarı bursu ile University of Westminster (London) BSc Honours Cognitive Science master eğitimine kabul edildim. 3 yıl ADA Grup Hastane ve Özel Rehabilitasyon merkezinde çalıştım. Ankara Üniversitesi'nde eğitim vermeye başladıktan sonra, çalışma hayatıma kurum müdürlüğü ile devam ettim. Askerlik eğitimimi Malatya Askeri Hastanesi Psikiyatri Kliniğinde 1 yıl süre ile çalıştıktan sonra tamamladım. Malatya Özel Anka Psikiyatri Dal merkezinde yarı zamanlı Klinik Psikolog olarak çalıştım. Psikometrik ölçüm ve analiz geliştirme projeleri üzerine 1 yıl çalıştım. Sağlık Bakanlığı Psikolojinin Tıbbi Uygulamaları yeterlilik ünvanını ve uzmanlık yeterliliğini tamamladım. 2009 yılından itibaren Devlet ve Vakıf Üniversiteleri'nde Fahri Öğitmenlik yapmaya başladım. Aynı dönemde (2009) Psikofiz Psikolojik Danışmanlık Merkezini kurdum. St. Clements Üniversitesinde 3. uzmanlığımı sürdürmekteyim. Halen kurumumda ve bazı özel sağlık ünitelerinde görev yapmaktayım. Ankara'da Psikofiz Psikolojik Danışmanlık Merkezi'nde çalışmalarına devam etmekteyim.



Grup La Minör

Bazıları eski dostlardı, ama yeni dostluklara da gönül kapıları açıldı. İçlerindeki sanat ruhunun dışa yansımaları önce ikili sohbetlerde dile geldi. Grubun akıl hocası Bay Z'nin (Ziya Anadolu) de öncülüğü ile başlayan küçük ve keyifli toplantılar yeni meslektaşların da katılımıyla 10 kişilik bir mevcuda ulaştı. Ne zaman kurulduk ve adımız ne zaman La Minör oldu hatırlamıyoruz, zira not almayı unutmuşuz! Grubun ismi konusunda çok sıkı tartışmalar yaşadığımızı hatırlıyoruz ama! Serde hekimlik ve akademisyenlik de olunca, antrum'dan chord vocal'e, fallopian'dan trigeminal'e uçtu kelimeler. Ne var ki her birinde Bay Z'nin, öne çıkarılan doktor kimliğimizle ilgili eleştirilerine maruz kaldık. Daha müzikal olsun diye, Do majör dedik maskülen oldu, Sol majör ise siyasi. Sonuçta Ankara'lı bir grup olarak La minör'de karar kıldık!

Aynı fakültede farklı branşlarda çalışan 10 akademisyenden oluşan Grup La Minör, yoğun ve tempolu akademik ve hekimlik yaşamının içerisindeki atomik boşlukların kaliteli değerlendirilmesinin güzel bir örneği olarak karşınıza çıkıyor.

Sevgiyle ve dostlukla bir araya gelmiş 10 arkadaş: Ziya Anadolu, Elvan Anadolu, Meltem Yalınay Çırak, Zeynep Aktaş, Çiğdem Elmas, Levent Oktar, Asburçe Olgaç, Serdar Kula, Ahmet Berkiz Turp, Aykut Özek

6 Haziran 2014, Cuma

17.00-18.00 Paramedikal Konferans: Eleştirel ve Yaratıcı Düşünme



Meltem YALINAY ÇIRAK

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni bitirdikten sonra Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji uzmanlık, Tıbbi Biyoloji ve Genetik doktora eğitimlerini tamamlamıştır. Moleküler Mikrobiyoloji ile ilgilenmektedir. Klimud Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Çalışma Grubu Başkanlığını sürdürmektedir. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2005 yılından beri tıp fakültesi yerleşik eğitim programında Eleştirel Düşünme ve Yaratıcı Problem Çözme derslerini vermektedir ve Eleştirel Düşünme ve Sanat Kurul Başkanlığı yapmaktadır. Düşünme terapisi üzerine eğitimler almıştır. Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde öğretim üyesi olarak çalışmakta ve uluslararası bir programda Klinik Psikoloji doktorası yapmaktadır.



SERENAS ÇOK SESLİ GENÇLİK KOROSU

1983 yılında Opera Çocuk Korosu adı altında kurulmuş olup, 1990 yılında Kültür Bakanlığı bünyesine geçmiştir. Koro; Prof. Saadettin ÜNAL, Sevim ÜNAL ve Mustafa ERDOĞAN ile çalışmış; kaset ve CD kayıtları yapmış; Otello, La Boheme operalarında, Fındıkkıran Balesinde ve Senfoni Orkestralarının konserlerinde görevler olarak başarılı çalışmalara imza atmıştır.

2014 Şubat ayı itibariyle Serenas' ın sosyal sorumluluk projesi desteği ile çalışmalarına **Serenas Çok Sesli Gençlik Korosu** olarak devam etmektedir. Ulusla-

rarası alanda birçok ödül kazanan koro Bu sene Bulgaristan' ın Varna kentinde düzenlenen 35. International May Choir Competition yarışmasında da ikincilik ödülüne layık görülmüştür. Koro, ülkemizi uluslararası platformlarında başarıyla temsil eden Kültür ve Turizm Bakanlığı Sanatçısı Şef Doç. Dr. Ahter DESTAN ile çalışmaktadır.

Serenas Çok Sesli Gençlik Korosu'nun misyonu; Türkiye'deki gençleri ses kaliteleri ve dünya standartlarındaki seçkin repertuarları ile Türkiye'ye ve dünyaya tanıtmak, yurt içinde ve dışında konserler verip, yarışmalara katılarak dünyadaki en iyi gençlik korolarının seviyelerine ulaşmaktır. Kaynağından yeni fışkıran bir ırmak gibi Türkiye'de gençlik koro müziği alanında hızlı ve köklü bir gelişme göstererek şaşırtıcı bir gelişim sağlamayı hedefleyen koro, bu amaç doğrultusunda çalışmalarını sürdürmektedir.

7 Haziran 2014, Cumartesi

17.15-18.00 Paramedikal Konferans: Fotoğraf Teknikleri Üzerine Sohbetler ve Yarışma Sonuçları



Atilla ÜNLÜEVCEK

Fotoğraf Sanatçısı AFSAD

Fotoğraf ile uğraşım ortaokul döneminde bir karne hediyesi ile başladı. Zaman içerisinde doğa fotoğrafçılığı ve sahne fotoğrafçılığı üzerine uzmanlaşma adına çalışmalara başladım. AFSAD (Ankara Fotoğraf Sanatçıları Derneği) üyesiyim. Bir dönem AFSAD yönetiminde yönetim kurulu üyesi olarak bulundum. Bir çok karma sergilere katıldım, yurt içi ve yurt dışında fotoğraf sunumları yaparak insanların fotoğrafa bakışını, ilgi ve beğenilerini sağlayarak algı düzeylerinin gelişmelerine katkıda bulundum. Değişik fotoğraf projelerinde çalıştım. Şu anda 2 ayrı konuda kapsamlı fotoğraf projelerinde yürütücü olarak çalışmaktayım. Son dört senedir fotoğrafı sevdirmek ve katılımcıların fotoğraf adına kaliteli fotoğraflar üretebilmesi için eğitimler vermekteyim. Eğitim amaçlı birçok seminerler düzenledim. Halen ODTÜ Mezunlar Derneği ve Türkiye Barolar Birliği'nde fotoğraf eğitimleri veriyorum.



İbrahim YÜCEL

Fotoğraf Sanatçısı AFSAD

16 Mart 1976, Malatya doğumluyum. İlköğrenimimi Malatya'da, ortaokul ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladım. 1993 yılında kayıt yaptırdığım Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü lisans eğitimimi 5 yılın sonunda yarım bırakmak durumunda kaldım. 2000 yılında, özel yetenek sınavı ile alım yapan Hacettepe Üniversitesi Güzel Sanatlar Fakültesi İç Mimarlık ve Çevre Tasarımı Bölümünü kazandım ve 2005 yılında buradan mezun oldum. 2005 yılından itibaren mesleğimi icra ediyorum. Özellikle mimari görselleştirme alanında kendimi geliştirmeye çalıştım.

2001 yılında aldığım, temel düzeyde fotoğraf ve karanlık oda eğitimini kapsayan dersi, fotoğrafla ilk bağlantım olarak sayıyorum. 2011 yılından itibaren de AFSAD (Ankara Fotoğraf Sanatçıları Derneği) bünyesindeki çeşitli seminer ve atölyelere katılarak, fotoğrafa biraz daha zaman ve emek ayırmaya çalıştım. Özellikle doğa ve makro fotoğraf alanları ilgimi gettiği için, ekipmanlarımı bu yönde oluşturmaya ve çalışmalarımı ağırlıklı olarak bu alanlarda yapmaya çalışıyorum. Fotoğrafla bağımlı biraz daha güçlendirebilmek beklentisiyle, 2012 yılında AFSAD'a üye oldum. Halen, yoğun ve monoton iş hayatından bulabilabildiğim fırsatlarda doğaya çıkıp fotoğraf üretmeye çalışıyorum.



R. Yavuz İLDİZ

Fotoğraf Sanatçısı AFSAD

Fotoğrafa gönül verme ve bilinçli olarak fotoğraf çekmemle birlikte karanlık oda çalışmalarına başlamam ortaokul sıralarında başladı, 1979-1980 yıllarında AFSAD 'da kendi karanlık oda imkanlarımla fotoğrafa gönül verenlere karanlık oda eğitimleri verdim. AFSAD 2009-2011 dönemi yönetim kurulu üyeliğinde bulundum. Kişisel ve karma sergilerim değişik zamanlarda ve salonlarda yer aldı. Yurt içi ve yurt dışı çeşitli fotoğraf yarışmalarında değişik kategorilerde ödüllere sahibim. Şimdiler de; yurt içi ve yurt dışında olmak üzere fotoğraf projeleri üzerinde çalışmaktayım. Pek çok kuruluş ve derneklerde fotoğraf eğitim ve işleme seminerleri vermekteyim.

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

**Konferanslar ve
Mini Konferans**

GENLERİ DEĞİŞTİRMEK HİÇ BU KADAR KOLAY OLMAMIŞTI

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Günümüzde kesin tedavisi yapılamayan hastalıkların başında genetik hastalıklar gelmektedir. Genetik hastalıkların kesin tedavisi, ancak hatalı genin yerine doğru dizileri içeren bir genin konması veya hatalı genin düzeltilmesi ile yapılabilir. Gen tedavisi adı verilen bu yöntemlerin ilki teknik olarak daha kolay olduğu için yıllardır öncelikle bu uygulanmaya çalışılırken, son yıllarda gen düzeltme yöntemlerinin hızla gelişmesi ve kolaylaşması dikkatleri bu yöne çekmiştir. Çünkü gen düzeltmek olanaklı olduğunda, sonuçlarının tam olarak ne olacağı bilinmeyen, fazladan bir genin hücrelere aktarılmasına gereksinim ortadan kalkmaktadır (1,2).

Biyoteknolojiye dayalı üretim, Herbert Boyer ve Stanley Cohen'in 1973 yılında insan insülin genini bakteriye klonlaması ve bu bakterinin kültürü ile insülin üretmesi ile başlamıştır. Jaenisch 1974 yılında viral vektör kullanarak ilk transgenik fareyi üretmiştir. İlk geliştirilen bu teknikler ile, genlerin hücre genomuna özgül bir hedef gözetmeden rastgele eklenmesi söz konusudur ve yıllarca bu konuda bir ilerleme sağlanamamıştır. Ancak 1996 yılında ilk çinko parmak (*zinc finger*) nükleazlar hazırlandığında genomda istenen hedef DNA dizisini kesmek ve değiştirmek olanaklı hale gelmiştir (1,2).

Gen düzeltme yöntemleri günümüzde hatalı tek bir nükleotidi değiştirecek kadar özgül hale gelmiştir. Tanımlanan yöntemlerin önemli bir kısmı, hatalı bölgenin özel olarak tasarlanmış endonükleazlar tarafından kesildikten sonra hücrenin doğal rekombinasyon mekanizmalarının kullanılarak düzeltilmesine dayanmaktadır (3). Düzeltme için kesilen bölgeye yeni bir DNA dizisinin eklenmesi, bir kısım DNA dizisinin çıkartılması ya da değiştirilmesi gerçekleştirilmektedir. Gen düzeltmede en önemli nokta, düzeltilen bölgenin çok özgül bir şekilde hedef alınması, genomun başka bölgelerine zarar vermeden hatalı genin düzeltilmesidir. Bu özgüllüğü sağlamak için hedef bölgenin özgül olarak endonükleazlar tarafından kesilmesi gerekmektedir.

Hatalı gen bölgesinin özgül olarak kesilmesi için geliştirilen ilk yaklaşım meganükleazlar ile kesim yapmasıdır. Özgül endonükleazlar (*restriction endonuclease*) özgül bir DNA dizisini tanıyarak çift zincirli DNA'yı kesen enzimlerdir. Özgül endonükleazların bakterileri bakteriyofajlara karşı korumak için evrimleştiği düşünülmektedir (4). Bugüne dek bakterilerde yüzlerce farklı DNA dizisine özgül binlerce özgül endonükleaz saptanmıştır. Özgül endonükleazların büyük bir kısmı, genelde 4-6 nükleotid gibi kısa DNA dizilerini tanıyarak keserler. Doğal olarak bu kadar kısa diziler bakterilerin kendi genomlarında da çok kez tekrarlanan dizilerdir. Bu nedenle bakteriler

bakteriyofaj DNA'sını keserken kendi DNA'larının zarar görmemesi için, kendi DNA'ları kopyalandıkça, taşıdıkları özgül endonükleaz bölgelerine metil grubu takarak, bu bölgeleri endonükleazlardan korurlar. Metillemeyi özgül metilazlar yapar ve hücrede bulunan her özgül endonükleaz için bu enzimin kestiği diziyi metilleyen özgül bir metilaz bulunur. Özgül endonükleazlar insan genomu gibi büyük bir DNA'yı çok sayıda yerden kestiği için gen düzeltme amacıyla yapılacak kesimlerde kullanılamazlar. Bu nedenle sadece hatalı gen bölgesini kesecek endonükleazlar bulunmuş, ya da genetik mühendisliği ile tasarlanmış ve üretilmiştir (5).

Sadece bir gen bölgesini kesebilecek meganükleaz adı verilen özgül endonükleazlar, gen düzeltme için kullanılan ilk enzimler arasında yer almıştır. Meganükleazların DNA'yı tanıdığı bölge 12-40 baz çifti uzunluktadır. Bu tür bir dizi genellikle genomda sadece bir yerde bulunur. Özellikleri en ayrıntılı olarak çıkartılmış meganükleazlar *Saccharomyces cerevisiae* mitokondrisinden izole edilen, I-SceI enzimi gibi LAGLIDADG ailesine ait olanlardır. Bu aile ismi DNA'ya bağlanan aminoasit motifinden gelmektedir. Bu motifin bağlandığı DNA dizisi bilindiği için her aminoasidin bağlandığı nükleotidlerle ilişkisi ortaya çıkartılabilmektedir. Bu motifteki aminoasit dizisi değiştirilerek enzimin bağlandığı nükleotid dizisi de değiştirilebilmektedir. Böylece değiştirilmek istenen gen bölgesini özgül olarak tanıyan bir enzim elde edilmektedir. Sadece bir DNA dizisinin kesilmesi için rekombinant DNA teknolojisi ile böylesine bir enzim hazırlamanın zorluğu ortadadır. Bununla birlikte çok fazla kişiyi etkileyen tek hatalı nükleotide bağlı, orak hücreli anemi gibi bir hastalığın tedavisinde kullanılabilecek bir gen düzeltme enziminin, yaygın olarak ve etkin bir şekilde kullanılabileceği öngörülebilir (5).

İstenen DNA dizisini tanıyan meganükleazları tasarlamak zor olduğu için, DNA dizilerini tanıyan protein motiflerinden yararlanılması düşünülmüştür. Bunlardan ilk akla gelen transkripsiyon faktörleridir. Bu proteinler, belli genlerden mRNA yapımını başlatmak ya da durdurmak için özgül DNA dizilerini tanıyarak bağlanan proteinlerdir. Bu proteinlerin birçoğunda çinko parmak denilen yapılar bulunur. Çinko parmaklar; tabanında iki sistein, iki de histidin bulunan ve bir çinko atomu ile bu aminoasitlerin birbirine bağlandığı parmak şeklinde bir kıvrımdan oluşan polipeptid yapılarıdır. İçerdikleri aminoasit dizilerine göre DNA'da farklı nükleotid dizilerine bağlanırlar. Her parmağın 3 farklı nükleotide bağlandığı belirlenmiştir. Hangi yapıdaki çinko parmağın hangi 3 nükleotide bağlandığı da bilinmektedir. Birbirini izleyen

6 çinko parmak 18 nükleotidi tanıyan bir polipeptit oluşur ki, bu uzunluktaki dizi genelde genomda bir yerde bulunur. Altı çinko parmak ve FokI enziminin DNA'yı kesen bölgesi birleştirilerek istenen DNA dizisini tanıyıp kesen çinko parmak nükleazlar rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiştir. FokI enziminin 5 nükleotidlik bir DNA'yı tanıma bölgesi bulunur. DNA'yı bu tanıma bölgesinden, bir zincirde 9 diğer zincirde 13 nükleotid sonrasında keser. Enzimin sadece kesim yapan C-terminalindeki kısım, çinko parmaklar ile birleştirilerek çinko parmak nükleazlar elde edilmiştir (6-9).

Benzer bir yaklaşım TALEN (*Transcription Activation Like EndoNuclease*) adı verilen proteinler ile ilk kez 2010 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu biyomühendislik ürünü proteinlerin DNA'ya bağlanan TAL kısımları, orijinal olarak *Xantomonas* türlerinden elde edilmiş, 33-34 tane, büyük oranda dizisi korunmuş aminoasitten oluşan bir proteindir. DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatma özelliği olan bu proteinlerin sadece 12 ve 13. aminoasitleri büyük oranda değişkenlik gösterir. Bu aminoasitler proteinin hangi DNA dizisine bağlanacağını belirler. İstenen diziyeye bağlanacak aminoasitler yerleştirilmiş TAL bölgesi, çinko parmak nükleazlarda olduğu gibi, FokI enziminin DNA'yı kesen kısmı ile birleştirilerek TALEN yani transkripsiyon aktivasyonuna benzer, bağlanarak çalışan endonükleazlar elde edilmiştir. Çinko parmak nükleazların hazırlanmasına göre TALEN'lerin hazırlanması daha kolaydır. Kesilecek DNA dizisini tanıma özgülüğünün artırılması için, TALEN'ler dizinin iki tarafına simetrik olarak bağlanacak şekilde tasarlanır. Yani uygun yerden her iki DNA zincirinin kesilmesi için iki farklı TALEN'in kullanılması gereklidir (10,11).

Meganükleaz, çinko parmak endonükleaz veya TALEN ile gen düzeltme amacıyla kesim yapıldıktan sonra, istenen DNA dizilerinin kesilen bölgeye katılması için hücrenin homolog rekombinasyon mekanizmalarından yararlanır. Kesilen bölgeye homoloji gösteren ve istenen doğru diziyi taşıyan bir çift zincirli DNA molekülü ortama konursa, hücre homolog rekombinasyon ile bu diziyi kesilen bölgeye ekleyerek DNA'yı tamir eder. Anlaşılacağı gibi, bu sistemlerin tümünde özgül kesim yapan oluşumun önceden emek gerektiren bir çalışma ile hazırlanması gerekmektedir. Oysa 2012 yılında geliştirilen CRISPR/Cas sistemi bu ön hazırlık aşamalarını ortadan kaldıran, uygulaması çok daha kolay, evrensel bir gen düzeltme yöntemi olarak karşımıza çıkmıştır (1,12).

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), gruplaşmış düzenli aralıklarla tekrarlayan kısa palindromik dizilerdir. Palindrom, "geriye doğru tekrarlayan" anlamına gelir; belli bir DNA dizisi için kullanıldığında, baştaki kısım dizinin ortasından sonra geriye doğru ters yönde dizi okunacak şekilde ileriye devam eder. Bu diziler bakterileri bakteriyofajlardan korumak için evrimleşmiş dizilerdir ve bakteriyofaj nükleik asitlerine homoloji gösterirler. Bakteriyofaj DNA'sı bakteri hücresine girdiğinde, CRISPR'den sentezlenen kısa RNA'lar "Cas" (*Crispr Associated*) nükleaz denilen bir enzime bağlanır. Bu enzim, bağlanan RNA'yı rehber olarak kullanarak bunun homoloji gösterdiği DNA dizisini bir noktadan keser

ve o noktadaki nükleotidi rehber RNA'daki nükleotide uygun olacak şekilde değiştirir. Bakterilerde virüslere karşı bir koruma sistemi olan CRISPR/Cas sisteminin 2013'de insan hücrelerinde de etkili bir şekilde gen düzeltme yapabildiği gösterilmiştir (12,13).

CRISPR/Cas sisteminin gelişmesi ile yakın gelecekte gen düzeltme yöntemleri, birçok genetik hastalığın kesin tedavisinde, günlük basit uygulamalar haline gelebilir. Hatta bir defada birden fazla gen düzeltme yapılabilir. Genetik hastalıklar dışında gen değiştirme, kanser gibi hastalıkların oluşmasında rol oynayan önemli proteinlerin yapımını bozarak tedavi sağlayabilir. Bugün kesin tedavisi olmayan enfeksiyon hastalıklarına yeni bir tedavi yaklaşımı getirebilir. Gen değiştirme yöntemlerinin kolaylaşması ve yaygınlaşması yeni etik sorunları da doğurabilir (14). Bitki, hayvan ve insan genlerinde yapılacak değişiklikler ile genetiği değiştirilmiş yeni nesiller ortaya çıkartılabilir. Bu değişiklikler hastalıklara dirençli nesiller oluşturmak gibi iyi uygulamaların yanı sıra, dünyadaki ekolojik dengeyi bozacak uygulamalar da olabilir. Bu nedenle genetik değiştirmenin etik yönünü bugünden tartışmaya başlamakta yarar vardır.

Kaynaklar

1. Esvelt KM, Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol Syst Biol* 2013; 9: 641.
2. Tan WS, Carlson DF, Walton MW, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet* 2012; 80:37-97.
3. Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244(4910):1288-92.
4. Roberts RJ. Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem* 1976; 4(2): 123-64.
5. Maria J. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends in Genetics* 1986; 12(6):224-8.
6. Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(26):12034-9.
7. Carroll D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther* 2008; 15(22):1463-8.
8. Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* 2010; 79:213-31.
9. Kim JS, Lee HJ, Carroll D. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. *Nat Methods* 2010; 7(2):91.
10. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol* 2011; 29(2): 135-6.
11. Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 2014; 39(12): e82.
12. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010; 327(5962):167-70.
13. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315(5819):1709-12.
14. Ardekani AM. Genetic technologies and ethics. *J Med Ethics Hist Med* 2009; 2:11

NÖTROFİL TUZAĞI

Prof. Dr. Güner SÖYLETİR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Doğal Bağışıklık Sisteminin İki Ucu Keskin Kılıcı

1880'li yıllarda İlya İlyich Mechnikov'un nötrofillerin doğal bağışıklık sistemindeki yaşamsal rollerini keşfinden bu yana, bu hücrelerin enfeksiyonla mücadelede patojen mikroorganizmaları ortadan kaldırmak üzere gerçekleştirdikleri fagositoz ve degranülasyon aracılığı ile hücre içi öldürmeye yönelik işlevleri hakkında oldukça detaylı bilgilere ulaşılmış durumdayız. Son yıllarda bu hücrelerin başarısının sadece fagositoz ve degranülasyonla sınırlı kalmadığını ortaya koyan çalışmalar, nötrofillerin aynı zamanda hücre dışına örümcek ağına benzer fibriler yapılar salarak yabancıyı öldürme fonksiyonlarını hücre dışında da gerçekleştirdiklerini göstermiştir. İlk kez 2004 yılında tanımlanan ve nötrofil ekstraselüler tuzağı (Neutrophil Extracellular Traps; NET) adı verilen bu ağ benzeri yapılar, bir yandan boyutları görece küçük mikroorganizmaların yok edilmesinde fagositoza ek bir öldürme fonksiyonunu yerine getirirken, diğer yandan mantar hifleri gibi fagositozları zor olan büyük yapıların bertaraf edilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu fonksiyon, NET'lerin enfeksiyonla mücadelede olumlu katkılarını göz önüne sermekle birlikte, hücre dışına saldıkları ağ benzeri yapılar içinde yer alan çeşitli moleküllerin inflamatuvar yanıtı artırmak ve hatta otoimmüniteye yol açmak gibi olumsuz yanlarının da irdelenmesi gerekir.

NET ve NEToz

Enfeksiyon bölgesindeki mikroorganizmanın ortadan kaldırılmasında, nötrofillerin fagositoz ve degranülasyondan sonraki son silahı NET oluşumu ve bu oluşumun hücre dışına salınımıdır. İnterleukin-8, lipopolisakkarit gibi uyarıcı moleküllerin hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanması ile aktive nötrofillerde dramatik düzeyde morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Hücre çekirdeği lobüler yapısını kaybetmekte, kromatinde gevşeme (dekondansasyon) meydana gelmekte, iç ve dış nükleer membranlar birbirinden ayrılmakta; eş zamanlı olarak içinde çeşitli antimikrobiyal etkili moleküller taşıyan granüllerin de parçalanması ile bu iki oluşum bir araya gelerek hücre içinde homojen bir kitle yapısına dönüşmektedir. Sonuçta yuvarlaklaşan ve kontraksiyonlar sonucu sitoplazmik zarı yırtılan hücreden, bu içeriğin tamamı hücre dışına NET olarak salınmaktadır. Doğaldır ki NET oluşumu ile sonuçlanan bu aşamadan sonra NEToz ("NETosis") adı verilen hücre ölümü gerçekleşmektedir. Hücre dışına çıkan ve içeriğinde granüllerden açığa çıkan elastaz ve myeloperoksidaz başta olmak üzere çeşitli antimikrobiyal etkili moleküller yer almakla birlikte, NET'in temel iskeletini kromatin oluşturmaktadır.

Kromatinin primer proteini olan histonların da granül içeriği antimikrobiyal moleküllerden 100 kat daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip oldukları göz önüne alındığında, henüz fagosite edilmemiş ya da fagosite edilemeyecek kadar büyük olan patojenlerin (mantar hifleri, prozoonlar, vb) ortadan kaldırılmasında NET oluşumunun oldukça önemli bir bir fonksiyona sahip olduğu görülmektedir.

NET ve Olumsuz Sonuçları

NET, yukarıda bahsedildiği gibi enfeksiyonla mücadelede önemli katkılar sağlamaktadır. Ancak; NET'in bizzat kendisi bazı hastalıkların oluşumuna neden olabilir. Diğer bir deyişle hastalıkla savaşmak ya da hastalığa neden olmak ikileminde önemli olan, NET'in doğru yerde, doğru zamanda ve doğru miktarda oluşmasıdır. NET'in rol oynadığı bazı patolojik durumlardan aşağıda kısaca bahsedilmektedir.

Kistik fibrozlu hastaların balgam örneklerinde inatçı ve aşırı yoğun bir şekilde nötrofil varlığı söz konusudur. Son yıllarda bu hastaların balgamlarında NET'in varlığı gösterilmiş olup, bunun temel iskeletini oluşturan kromatinin balgamın aşırı viskoz yapısında önemli rolü olduğu ortaya konmuştur. Diğer yandan NET içeriğindeki elastaz da bu hastalardaki akciğer hasarında rol oynamaktadır.

Otoimmün hastalıklarda, kişinin kendi antijenlerine karşı immün yanıt oluşturduğu bilinen bir durumdur. Özellikle sistemik lupus eritematozus (SLE)'de oluşan antikolar; DNA, histon ve nötrofil proteinlerine (ANCA: Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody) karşıdır ki, tüm bu yapılar NET'in temel içeriğini oluşturmaktadır. Hem bu bağlantı, hem de SLE ataklarının özellikle enfeksiyonlarla indüklendiği dikkate alınarak, SLE etiolojisinde NET'in rolü olabileceği iddia edilmektedir. Nitekim, yapılan çalışmalarda SLE hastalarındaki nötrofillerin NET oluşturmaya daha yatkın oldukları ve bu hastaların, oluşan NET'lerin vücuttan temizlenmesinde yetersiz kaldıkları gösterilmiştir. Dolayısıyla bu hastaların sürekli NET içeriklerine maruz kalmaları, bir yandan doğrudan doku hasarına neden olurken, diğer yandan ortamda sürekli var olan otoantijenler nedeniyle otoimmün yanıtın artmasına yol açmaktadır.

Oluşan patolojileri NET ile ilişkilendirilen diğer hastalıklar arasında periodontit, preeklampsi, gut artriti, derin ven trombozu ve kanser sayılabilir.

Sonuç olarak, ilk kez tanımlandığı 2004 yılından bu yana üzerinde çalışmaların yapıldığı nötrofil ekstraselüler tuzağı, gerek enfeksiyonların tanı ve prognozu açısından

laboratuvar ve klinisyene ne olanaklar sağlayabileceği, gerekse patogenezlere bizzat kendisinin rolü olabileceğinin düşünüldüğü hastalıklarda tedavi stratejisinin önemli bir parçası olup olmayacağı konularında yapılacak araştırmalar açısından bilim insanlarının yoğun ilgisini çekmeye devam edecek gibi görünmektedir.

Kaynaklar

- Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol* 2013; 35(4): 513-30.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663): 1532-5.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012; 198(5):773-83.
- Cooper PR, Palmer LJ, Chapple IL. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol* 2000 2013; 63(1):165-97.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176(2): 231-41.
- Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis-the journey of TF through NETs. *Front Immunol* 2012; 3:385.
- Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol* 2012; 189(6): 2689-95.
- Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009; 30(11):513-21.
- Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, et al. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 2011; 18(4):581-8.
- Yu Y, Su K. Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *J Clin Cell Immunol* 2013; 4. pii: 139.

MİKROBİYOLOJİK TANIDA ESKİ SORUNLAR VE YENİ YAKLAŞIMLAR

Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU

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

Enfeksiyon hastalıkları dünyada hala başlıca ölüm nedenleri arasındadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2011 yılı verilerine göre tüm dünyada alt solunum yolu enfeksiyonları, ishal ve HIV/AIDS ölüm nedenleri arasında ilk 10 sırayı almaktadır ve 2011 yılında bu enfeksiyonlardan 7.7 milyon kişi ölmüştür. Bu üç enfeksiyon toplam ölümlerin sırasıyla %6.7, %4.7 ve %3'ünden sorumludur. Daha önce ilk 10 arasında yer alan tüberküloz 2011'de 15. sıraya gerilese de 1 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur (1). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Türkiye'de 2013 yılındaki 320.967 ölümün 5.366'sı (~%1.7) enfeksiyonlara bağlıdır (2).

Diğer yandan, son 30 yıl içinde neredeyse her yıl en az bir yeni tanımlanan enfeksiyon ortaya çıkmıştır (3). Amerikan Ulusal Bilimler Akademisi tarafından tanımlanan 1.461 insan enfeksiyonunun yaklaşık %60'ı zoonotiktir (4). İklim değişiklikleri ve ekosistemin tahrip edilmesi yeni zoonotik ve vektör aracılıklı enfeksiyonların başlıca nedenleridir (5). Yeni zoonozların oluşturduğu tehdit, insan, hayvan ve ekosistem sağlığı alanlarında işbirliğinin gerekliliğini ortaya çıkarmış ve bu işbirliği alanı "tek sağlık" kavramı altında tanımlanmıştır (6). Tarım, hayvancılık, gıda güvenliği ve yaban yaşamı tek sağlık kavramının ayrılmaz parçalarıdır (7). Zoonotik tehditler tek yönlü değildir. Son yıllarda insanlardan hayvanlara geçen ve aralarında MRSA, influenza A, *Cryptosporidium parvum* ve *Ascaris lumbricoides*'in bulunduğu çok sayıda patojen bildirilmiştir (8). Bu durum zoonoz veya tersine zoonoz olarak adlandırılmaktadır (8).

Türk Tabipleri Birliği ve Türk Veteriner Hekimleri Birliği 2009 yılında "Tek Dünya Tek Sağlık" başlıklı ortak bir deklarasyon yayımlayarak Sağlık Bakanlığı ile Tarım Bakanlığı'nın tek sağlık kavramına uygun bir sistem oluşturmaları, Veteriner Halk Sağlığı Birimi kurulması, zoonozlara yönelik epidemiyolojik çalışmaların artırılması ve entegre bir veri tabanı oluşturulması ile tıp, veteriner fakülteleri ve araştırma enstitüleri arasında işbirliği yapılması istenmiştir (9).

Zoonozlar ve diğer halk sağlığı tehditlerinin erken dönemde fark edilmesi tehditin büyümeden sınırlandırılmasını sağlar. Bu nedenle DSÖ 2005 yılında yayınladığı Uluslararası Sağlık Tüzüğü (UST) ile halk sağlığı tehditlerinin erken dönemde saptanması ve kontrol altına alınmasını sağlamaya yönelik erken uyarı ve yanıt sistemleri (EUYS) kurulmasını zorunlu kılmıştır. UST, mikrobiyoloji laboratuvarlarına bulaşıcı hastalıkların erken dönemde saptanmasına yönelik özel bir önem atfetmiştir. Laboratuvarların bu işlevlerini etkin biçimde yerine getirmesi doğru, yenilenebilir ve zamanında sonuç vermesi ile iliş-

kilidir. Bu bağlamda, kültür-temelli yöntemlerin doğası gereği geç sonuç vermesi yeni ve hızlı tanı yöntemlerini gündeme getirmiştir.

Bu konuşma, bilinen ve yeni mikrobiyolojik tehditlere yönelik yaklaşımları üç düzeyde ele almaktadır. İlk düzey, enfeksiyonların tanısı ve kontrolünde "tek sağlık" yaklaşımına ilişkindir. İkinci düzey, mikrobiyoloji laboratuvarlarının erken uyarı ve salgın yönetimindeki yeri ile ilişkilidir. Üçüncü düzey ise, ilk iki düzey bağlamında yeni ve hızlı tanı yöntemlerinin yerine ilişkindir. Burada tartışılanların yazarın kişisel görüşlerini yansıttığı ve deneme niteliğinde olduğu gözden kaçırılmamalıdır.

İlk düzeye ilişkin zoonozlar ve vektör kökenli enfeksiyonlarda konakçı hayvanlar ve vektörlere yönelik entegre surveyans programlarının öneminden söz edilecek ve örnekler verilecektir (10). İkinci düzeye ilişkin olarak ise iki yaklaşımdan söz edilecektir. Bunlardan ilki sendromik algoritmaların kullanımınıdır. Bu yaklaşım, klasik hastalık belirtileri olmayan hastalarda tanısal sürecin mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yürütülecek algoritmalarla belirlenmesine dayanmaktadır. İkinci yaklaşım olarak ise, mikrobiyoloji laboratuvarlarının erken uyarı ve surveyans sistemlerine katkısını artırmaya yönelik elektronik laboratuvar bildirim sistemi ve sistem içinde klinisyenlerin rolleri tartışılacaktır (11). Üçüncü düzeye yönelik olarak ise, tanısal süreçleri hızlandıracak yeni teknolojilerin önemi ve yerinden söz edilecektir (12).

Kaynaklar

1. World Health Organization. The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en>
2. Türkiye İstatistik Kurumu. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2013. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=16162>
3. World Health Organization. Combating Emerging Infectious Diseases in the South East Asia Region, 2005. http://www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/documents/SEA_CD_139/en/index.html
4. Smolinski MS, Hamburg MA, Lederberg L (eds); Committee on Emerging Microbial Threats to Health in the 21st Century; Board on Global Health; Institute of Medicine, Microbial Threats to Health: Emergence, Detection, and Response. 2003, The National Academies Press, Washington, DC. <http://www.biosecurity.sandia.gov/ibtr/subpages/papersBriefings/2003-2004G/2003NASEmergenceDetectionandResponse.pdf>
5. Kahn L, Kaplan B, Monath T, Woodall J, Conti L. A manifesto for planetary health. *Lancet* 2014; 383(9927):1459.
6. Dórea FC, Dupuy C, Vial F, Reynolds TL, Akkina JE. Toward one health: are public health stakeholders aware of the field of animal health? *Infect Ecol Epidemiol* 2014; 4. doi: 10.3402/iee.v4.24267.
7. Bidaisee S, Macpherson CN. Zoonoses and one health: a review of the literature. *J Parasitol Res* 2014; 2014: 874345.

8. Messenger AM, Barnes AN, Gray AC. Reverse zoonotic disease transmission (Zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. PLoSOne 9(2): e89055.
9. Türk Tabipleri Birliği. Tek Dünya Tek Sağlık. 2009. <http://www.ttb.org.tr/index.php/Haberler/tekdunya-1561.html>
10. Braks M, van der Giessen J, Kretzschma M, et al. Towards an integrated approach insurveillance of vector-borne diseases in Europe. Parasit Vectors 2011; 4: 192.
11. Fisman DN, Laupland KB. The 'One Health' paradigm: time for infectious diseases clinicians to take note? Can J Infect Dis Med Microbiol 2010; 21 (3): 111-4.
12. Cronquist AB, Mody RK, Atkinson R, et al. Impacts of culture-independent diagnostic practices on Public Health Surveillance for Bacterial Enteric Pathogens. Clin Infect Dis 2012; 54 (Suppl 5): S432-9.

İMMÜN SİSTEMİN YAŞLANMASI VE AŞILARA YANITI

Prof. Dr. Selim BADUR

Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul

İnsan vücudu, mikroorganizmalar başta olmak üzere dış “düşmanlara” karşı farklı yolları kullanarak direnmeye, diğer bir tanımlamayla “hastalanmamaya” çalışır. Teknolojik ilerlemeye paralel olarak söz konusu direnç mekanizmasının ayrıntıları ve karmaşıklığı gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. Nitekim savunma mekanizmalarından biri ya da diğerinin, yabancı etkenin türüne ve yerleşim bölgesine göre daha ağırlıklı olarak devreye girdiği; örneğin genel anlamda, hücre dışı bakterilere karşı fagositoz mekanizması ya da humoral yanıt etkili olurken, hücre içi parazitler olarak tanımlayabileceğimiz viruslarla savaşta **sitotoksik T hücrelerinin (Tc)** ön plana geçtikleri belirlenmiştir. Bir virus enfeksiyonunu örnek alırsak, tüm olup biten, vücuda giren etkenin hedef aldığı hücreyi tanıyıp ona bağlanması ve içine süzülerek uygun bölgesine yerleşmesi ile başlar. Burada virusun genomu transkripsiyon, transkripsiyon ve replikasyon aşamalarından geçer ve sonuçta oluşacak yeni virus partikülleri etrafa yayılarak başka hücreleri enfekte etmeye çalışırlar. Konak savunma sistemi ise bir an önce bu istenmeyen yabancıyı algılayıp, virusun özelliklerine göre farklı yolları kullanarak söz konusu “düşmanı” süratle yıkıma uğratmak için çaba gösterir.

Klasik olarak savunma sistemi, doğal ve edinsel bağışıklık olarak tanımlanan iki aşamada ele alınır; ancak bu ayırım tamamen kuramsal bir yaklaşımdır ve aslında her iki mekanizma birbirleriyle iç içe, dayanışma göstererek çalışırlar. Örneğin doğal bağışıklığın önemli yapıtaşlarından olan **doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücreler** ve makrofajlar, salgıladıkları sitokinler ile edinsel bağışıklığa ait B ve T lenfositlerinin aktivasyonunda rol oynarken; humoral yanıtın yapıtaşları olan antikorlar, opsonizasyona katkıda bulunarak doğal bağışıklığın etkili bir parametresi olan fagositoza destek olurlar.

Genel Anlamda İmmün Sistemin Yapılanması

Yaş ilerledikçe immün sistemde oluşan değişiklikleri irdeleyebilmek için öncelikle normal fonksiyonlarını hatırlamak gerekir. Bu bölümde savunma sistemi, yabancıya karşı öncelikle etkili olan doğal bağışıklık mekanizmaları ve sonra edinsel bağışıklığın özellikleri dikkate alınarak özetlenmiştir.

1- Doğal bağışıklık genel anlamda bellek özelliği bulunmayan, etkene özgüllük göstermeyen ve erken savunma sistemini oluşturan bir dizi yapıtaşından oluşur. Mikroorganizmaların birçoğu, bu ilk engele takılırlar ve böylece vücuda girmeleri engellenmiş olur. Bu savunma sınırını aşabilen yabancılar, bu kez etkene özgül edinsel bağışıklık yapıtaşlarını karşılarında bulurlar. Doğal ba-

ğışıklığın ilk aşamasını, bütünlüğü bozulmamış deri ve mukoza tabakası oluşturur; nitekim sağlam bir deriden, kuduz virusu gibi birçok önemli enfeksiyon etkeninin geçmediği bilinmektedir. İkinci sırada bir dizi hücre bulunmaktadır; viral enfeksiyonlar örneğini alırsak özellikle edinsel bağışıklığın devreye girmedeği erken dönemde bu hücrelerden NK'ların önemi son yıllarda ayrıntılı olarak ortaya konmuştur (1). Enfekte hücreler ile NK'lar arasındaki ilişki aktivatör ve inhibitör reseptörlerce düzenlenir ve hedef hücre, perforin ve granzimlerin rol oynadıkları granül eksositozu ile ve Fas-FasL reaksiyonu sonucu gelişen apoptotik mekanizma ile yok edilir. Ayrıca sitotoksik T lenfositlerinden farklı olarak, NK'ların “**antikora bağımlı hücrel sitotoksiste**” uyarınca da hedeflerini imha ettikleri bilinmektedir. Ancak NK'ların savunmadaki rolleri sadece enfekte hücre lizisi ile sınırlı kalmaz; bu hücreler antiviral etkinliğe sahip inflamatuvar sitokinler (örneğin IFN- γ) üreterek de savunmada rol oynarlar (2). Son yıllarda, NK'ların sitolitik özellikleri kadar, bu hücrelerin ürettikleri IFN- γ ya da TNF- α gibi sitokinlerin antiviral mücadelede aktif rol oynadıkları; başta CMV ve HSV gibi DNA virusları ile, influenza ya da Coxsackievirus gibi RNA viruslarına karşı sitokine bağımlı NK aktivitesinin önemi- ne dikkatler çekilmektedir. NK hücrelerinin yüzeylerinde yer alan reseptörlerden bazıları (CD 16, CD 2, NKR-P1, CD 28, Ly 6, CD 69 gibi) sitoliz ve sitokin üretimini uyarırken, diğer bir grup reseptör (Ly 49, KIRs, CD 94/NKG2 gibi) belirlenen işlevleri baskılama görevini üstlenmişlerdir.

Doğal bağışıklık yapıtaşları grubunda yer alan granülositler, NKT hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC) de, özellikle salgıladıkları immüno-regülasyon sitokinleri ya da nitrik oksit (NO) gibi maddeler aracılığı ile antiviral yanıtta katkıda bulunurlar (3). Örneğin nötrofiller, ürettikleri TNF- α ve NO ile akciğerlerdeki RSV, korneadaki HSV enfeksiyonlarını baskılamakta; eozinofiller ise RSV ye karşı sentezledikleri granül ribonükleazları (EDN/RNaz 2 ve 3) ile etkili olmaktadır. Ayrıca eozinofiller ve bazofiller, TNF- α , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 ve GM-CSF gibi antiviral ve immüno-regülasyon özellikte sitokinler üretmektedirler. Benzer şekilde, DC'lerin IFN- α/β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 ve IL-18 sentezledikleri; makrofajların ise IL-1 ve TNF- α ile HSV'ye, IL-12 ile de HBV'ye etkili oldukları, kemokinler salgılayarak inflamatuvar hücreleri çekebildikleri belirlenmiştir.

Kompleman sistemi doğal direnç kapsamında ele alacak olduğumuz ve antiviral savunmada önemli rolü olan bir diğer parametredir. Üç farklı yoldan (klasik, alterne ve lektin aktivasyon yolları) aktive olabilen ve 30 kadar inaktif yapıtaşından oluşan kompleman sistemi harekete

geçtiğinde, dolaşıma bir dizi efektör madde (C3b, C5b, C4b, C5a, C3a gibi) salınır. Bu moleküllerin opsonizasyon, inflamasyon, anafilaktik şok gibi önemli reaksiyonlarda görevleri vardır. Sistemin işleyişini, bir dizi regülatör protein (CR1, MCP, H, I, P, CD59 gibi) ve salgılanan kompleman ara ürünlerinin hedef hücrelere bağlanmalarını sağlayan özel reseptörler (CR1-4 gibi) denetler. Kompleman kaskadının çalışması, yapıştıkları hedef hücre yüzeyinde “**membranı zedeleyen yapı**” (**membrane attack complex; MAC**) olarak tanımlanan bir deliğin oluşumu ve hücrenin yıkımı ile sonlanır. Ancak MAC oluşumu ile enfekte hücrelerin yok edilmesi, pratikte büyük önem taşımaz ve kompleman sisteminin önemi, çalışmaya başladığında ara ürün olarak ortaya çıkan efektör moleküller aracılığı ile gerçekleşir. Bu arada kompleman sisteminin aktivasyonu sadece doğal direnç kapsamında ele alınacak etkinlikler ile kısıtlı değildir; sistemin çalışması ile özgül bağışıklığın ve özellikle B ve T lenfosit yanıtının düzenlenmesi de gerçekleşir. Bu nedenle kompleman sisteminin doğal direnç ve özgül bağışıklık ilişkisini düzenlemede de rol oynadığını söylemek yanlış olmaz (4).

Doğal direnç konusunu tamamlamak için **sitokin** dünyasına göz atmamız gerekir. Örneğin enfekte hücrelerden salınan ve henüz etken ile karşılaşmamış komşu hücrelerin enfekte olmalarını engelleyen interferonların (IFN) antiviral etkileri 1950’li yıllardan beri bilinmektedir. JAK-STAT yoluyla uyarılan **IFN** sentezi, etki ettikleri hücrelerde virus replikasyonunu bozan protein kinaz, 2’,5’-oligoadenilat sentetaz, adozin deaminaz ve Mx proteinleri gibi maddelerin sentezini uyarır. Ayrıca IFN’lar özel bir tür NO sentazın (iNOS2) ve MHC-I ve -II moleküllerinin sentezini uyararak enfeksiyonlara karşı yanıtta çok yönlü roller üstlenmektedirler (5). Viral immünopatogenez konusu ele alındığında sitokinlerin ve özellikle **kemokinlerin** ne denli önemli görevler üstlendikleri gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. Örneğin doğal direnç kapsamında ele alınan NK’ların ya da eozinofillerin antiviral etkinliği konusunda CC-kemokinlerin uyarıcı rolleri olduğu; özgül bağışıklık kapsamında ise CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerin aktive olmalarında kemokinlerin gerekliliği çeşitli virus modellerinde gösterilmiştir (6). Yukarıda, antiviral etkiye sahip sitokin üreten hücrelere ait örnekler verilmiştir. Son yıllarda doğal direnç kapsamında ele alınan defensinler gibi bir dizi anti-mikrobiyal peptidin de önemli roller üstlendikleri anlaşılmıştır.

Kısacası bir dizi hücre ve çözülmüş madde doğal direncin yapıtaşları olarak karşımıza çıkarlar ve bunlardan bazıları *yabancıya* karşı çok etkindir. Bu yapıtaşlarının ortak bazı özellikleri bulunur. Örneğin, insan organizması için “yabancı” olarak sayılan virusları ve enfekte ettikleri, bir başka tanımlamayla “farklılaşmış” hücreleri tanıma özelliğine sahip olmalarına karşın, mikroorganizmalar dışındaki maddeleri algılayamazlar. Ayrıca “yabancıyı” tanımak için kullandıkları reseptörler, sadece mikroorganizmalara özgü yapıları “görürler”, konak hücreye özgü yapıları algılayamazlar. Doğal bağışıklığın yapıtaşları, çeşitli bakteri, virus veya mantarları tanıma özelliğine sahiptirler. Örneğin fagositik hücreler, birçok bakteri hücrelerinde ortak olarak bulunan ancak memeli hücrelerinde

rastlanmayan lipopolisakkarid moleküllerini (LPS veya endotoksin) tanıyan reseptörler taşırlar; aynı hücreler bakteri glikoproteinlerinin terminal bölgesinde yer alan mannoz molekülünü tanıyan reseptörlere sahiptirler. Virusların tanınmasına gelince, örneğin fagositik hücreler bu mikroorganizmaların replikasyon döngüsünün belirli bir aşamasında ortaya çıkan, memeli hücrelerinin sahip olmadığı, çift zincirli RNA (dsRNA) yapısını tanımaktadırlar. Ayrıca yüzeylerinde taşıdıkları alışılagelenin dışındaki polimer yapılar ya da memeli hücrelerinde bulunmayan farklı yüzey molekülleri de virusları ele veren diğer yapılarıdır. Sonuç olarak doğal direncin yapıtaşları mikroorganizmaların ortak olarak taşıdıkları, ancak memeli hücrelerinde bulunmayan yapıları tanımaktadırlar ve bu ortak yapıları **moleküler örgüler** ya da **kalıplar** (pathogen-associated molecular patterns; **PAMPs**) adı verilir. Geniş anlamda **örgüleri tanıyan reseptörler** (pattern recognition receptors, **PRRs**) olarak isimlendirilen doğal dirence ait reseptörlerin [örneğin; Toll benzeri reseptörler (TLR), N-formil metionil reseptör, mannoz reseptörü, NOD benzeri reseptörler (NLR), RIG-I-benzeri reseptörler] tanıdığı bu ortak yapıların bir diğer ilginç ve önemli özelliği, bu bölgelerin mikroorganizmalar için yaşamsal öneme sahip bölgeler olmalarıdır. Yani doğal direnç, mikroorganizmalardaki olmazsa-olmaz bölgeleri algılamaktadır. Bu durum pratikte büyük önem taşır; zira bilindiği gibi viruslar mutasyona eğilimlidir; yani şu ya da bu nedenle, ama özellikle kendilerine karşı oluşan saldırılardan kaçabilmek için kullandıkları, “değişime uğrayabilme” yetisine sahiptirler. Buna karşın yukarıda belirtildiği gibi, doğal direncin tanıdığı bölgeler değişime kapalı, sabit bölgelerdir. İşte bu nedenle, mutasyonlarla şekil değiştirerek, birazdan bahsedilecek olan özgül bağışıklığın etkisinden kendilerini koruyabilseler de, doğal direncin sabit, değişmeyen yapıları tanıma özelliğinden ötürü, mutasyonlara rağmen immün sistemden kaçamazlar.

2- Edinsel bağışık yanıt ise, doğal bağışıklığın yukarıda belirtilen çeşitli parametreleri viral enfeksiyonu alt etmede başarısız kaldığında devreye girmektedir. Bu tür yanıtın harekete geçmesi için her şeyden önce CD4⁺ T lenfositlerinin (**yardımcı T lenfositleri; Th**) aktive olmaları ve salgılayacakları sitokinler aracılığı ile hümmoral ve/veya hüresel yanıtı uyarmaları gerekir. Ancak herhangi bir virusun direkt olarak Th hücrelerini harekete geçirmesi mümkün değildir ve öncelikle yabancı antijenin profesyonel bir **antijen sunan hücre (ASH)** tarafından alınarak öğütülmesi; daha sonra yüzeyindeki MHC-II molekülünün oluşunda bu yabancı antijeni Th hücrelerine sunması gerekir. DC’ler ve makrofajlar gibi profesyonel ASH’ler ekzojen antijenleri içlerine alarak bir dizi işleme tabi tutarlar ve endoplazmik retikulumlarında sentezledikleri MHC-II molekülleri ile veziküllerde birleşirler; sonuçta MHC-II’ler oluklarına yerleştirdikleri öğütülmüş antijeni, Th hücrelerine sunarak onların aktive olmalarını sağlar (7). Bu aşamada uyarıyı alan Th’ler ortamdaki sitokinlerin ve uyarıyı yapan antijenin özelliklerine göre Th-1 veya Th-2 şeklinde tanımlanan ve değişik sitokin grupları üreten hücre tiplerine farklılaşırlar. Oluşan bu iki farklı Th alt grubu, daha sonra gelecekte yanıtın hüresel ya da hümmoral yönde yoğunlaşmasını belirler.

Hücresel bağışıklık, viruslarca istila edilmiş olan enfekte hücrelerin yıkımını sağlayan mekanizmaları içermektedir. Th hücrelerden aldıkları uyarının da katkısıyla, bu kez T lenfositlerinin bir diğer tipinin, CD8⁺ T hücreleri özelliğindeki Tc'lerin, virus üretim fabrikaları gibi çalışan enfekte hücreleri lizise uğratmaları söz konusudur. Nöronlar dışındaki tüm çekirdekli hücreler, yüzeylerinde MHC-I molekülü taşırlar; işte bu tip bir hücre viruslar tarafından enfekte edildiğinde, endojen antijenin proteazoma bağımlı parçalanması gerçekleşir ve parçalanma ürünleri olan peptitler, MHC-I oluşuna yerleşerek hücre yüzeyine çıkıp, Tc'leri harekete geçirirler. Bu uyarı sonrası Tc'ler, hem sitotoksikite yaparak, hem de TNF, IFN- γ gibi bir dizi sitokin salgılayarak antiviral yanıtı katılırlar (8). Son yıllarda hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelerinin antiviral yanıtı katkıları üzerinde önemle durulmaktadır. Tc'lerin sentezledikleri TNF- α veya IFN- α/β 'nin HBV'nin gen ekspresyonunu inhibe ettikleri; Th'ların ise transgenik farelerde gösterildiği şekliyle yine sitokinler aracılığı ile HBV enfeksiyonunu baskıladıkları saptanmıştır.

Edinsel bağışıklığın ikinci kolunu **hümorale yanıt** oluşturur. Bu kez devrede olan, aktif olarak antikor sentezleyen B lenfositleridir. Th-2 grubu sitokinlerin katkısıyla, antijen uyarısı sonunda B lenfositlerinin bir bölümü antikor üreten plazmositlere dönüşürler; sonuçta sentezlenecek nötralizan antikorlar hem virusların hedef hücrelerine bağlanmalarını bloke ederek, hem de antikora bağımlı hücresel sitotoksikite ya da opsonizasyon veya kompleman sisteminin aktivasyonu gibi roller üstlenerek, indirekt yoldan antiviral etkinlik göstermiş olurlar.

Farklı Aşı Antijenlerine Karşı Gelişen Primer Antikor Yanıtı

Antikor üretecek B hücrelerinin aktivasyonu, ana hatlarıyla iki farklı biçimde gerçekleşmektedir. Protein yapısındaki antijenler söz konusu ise B ve Th hücrelerinin aktive olmaları; B lenfositlerinin ikincil lenfoid organların germinal merkezlerinde (GM) çoğalmaları ve antikor üreten plazma hücreleri ile bellekli B hücrelerine farklılaşmaları gerçekleşir. Polisakkarid yapıdaki antijenler ise T hücreleri uyarılmaksızın, GM dışında daha kısa süreli ve daha düşük titrede antikor yanıtına yol açarlar. Ayrıca bu modelde bellek özelliğinin sağlanması söz konusu değildir (9). Bu iki farklı uyarı mekanizmasının ayrıntıları aşağıda özetlenmiştir.

a) Protein yapısındaki aşılar karşı TD (T-Dependent) özellikte yanıt:

Bu tip bir uyarı, hem ekstrasfoliküler alanda, hem de GM'lerde gerçekleşir. Kemik iliğinden kaynaklanan B hücreleri karşılaştıkları antijeni IgM yapısındaki yüzey reseptörleri aracılığı ile yakalarlar; antijenin bağlanması sonucu uyarılan B lenfositleri aktive olur ve yüzeyindeki kemokin reseptörü (CCR7) sayısı artar. Bu reseptör, aktive hücrenin ikincil lenfoid dokulardaki T hücre bölgelerine doğru yönelmesinde rol oynar. Burada antijene özgü B hücresi, uyarı aldıkları için B'lerin gereksinimi olan aktivasyon sinyallerini gönderecek dendritik hücreler ve T hücreleri ile ilişki kurar. Sonuçta B hücrelerinin, düşük afiniteye sa-

hip antikor sentezleyecek kısa ömürlü plazma hücrelerine dönüşümleri gerçekleşir (Ekstrasfoliküler reaksiyon) (10).

Immünooglobulin (Ig) izotip dönüşümü (IgM'lerden IgG, IgA veya IgE'ye dönüşüm), aktivasyonu uyaran deaminaz enziminin (activation-induced deaminidase enzyme; AID) etkisiyle B hücre farklılaşması aşamasında gerçekleşir. Ekstrasfoliküler alanda gerçekleşen bu dönüşümde Th1 ve Th2 tipi CD4⁺ hücrelerin katkısı vardır ve CD40L'leri ile B hücrelerinin CD40 yüzey moleküllerinin etkileşimi farklı izotip ve alt sınıftan Ig'lerin üretimini sağlar. Ekstrasfoliküler reaksiyon süratle gelişen bir olaydır ve bağışıklamayı izleyen birkaç gün içinde IgM'ler ile az sayıda IgG ortaya çıkar. Ancak bu aşamada sentezlenen antikorlar hipermutasyona uğramazlar, kısa ömürlüdürler ve süratle apoptoz uyarınca yıkıma uğradıklarından aşının etkinliğinde önemli bir rolleri yoktur. Bu arada bir grup B lenfositleri GM'de antijene özgü T hücrelerinden yardım alarak çoğalır ve plazma hücrelerine dönüşürler. Bu yerleşim alanına göçen az sayıdaki B lenfositinin yüzeyinde CXCR5 ekspresyonu artmıştır ve CXCL13 taşıyan foliküler dendritik hücre (fDH)'ler tarafından B hücre folikülleri adı verilen alanda yoğunlaşırlar. fDH'ler antijeni uzun süre içlerinde barındırmaları ve antijene özgü B/T lenfositlerini kendilerine çekebilme özellikleri ile B hücre yanıtında önemli rol oynarlar. fDH'lerin yanı sıra Tfh hücrelerinden de gerekli sinyalleri alan B lenfositleri yoğun klonal proliferasyona uğrarlar. Bu gelişme sonunda Ig izotip dönüşümü ve B hücrelerinin özgül antijenlerine karşı afinite olgunlaşması gerçekleşir. Bu hücreler fDH'lerin yüzeyindeki aşı antijenlerine bağlanırlar, antijeni içlerine alıp işleyerek onları küçük peptidlere ayırırlar ve MHC-II molekülleri eşliğinde yüzeylerine taşırlar. Artık B hücrelerince pMHC-II kompleksinin özel bir CD4⁺ T hücre grubuna sunum aşamasına gelinmiştir. Reseptörleri, transkripsiyon faktörleri ve ürettikleri interlökinler açısından Th1 ve Th2 hücrelerinden ayrı bir grup hücre olan Tfh'ler, sahip oldukları yapısal özellikler uyarınca (CD40L, ICOS, IL-10 ve IL-21 taşımaları/üretmeleri gibi) asıl görevleri olan B lenfositlerini uyarma işlevini güçlü biçimde gerçekleştirirler (11). Sonuçta; GM'de yer alan antijene özgü B lenfositlerinin, antijeni taşıyan fDH'ler ve antijene özgü Tfh hücrelerinin işbirliği ile yüksek afiniteye sahip B lenfositlerinin etkin hale geçmeleri; antikor üreten plazma hücreleri ve bellek hücrelerine farklılaşmaları söz konusu olacaktır. GM'deki tüm bu gelişmeler birkaç haftalık süre gerektirir ve protein yapısındaki aşı antijenlerine yüksek afinite gösteren IgG sınıfı antikorlar, uyarıdan 10-14 gün sonra kanda belirirler. Antijene özgü plazma hücrelerinin yeterince üretilmelerini takiben, ilk uyarıdan 3-6 hafta sonra GM'deki gelişmeler son bulur; böylece primer bağışıklamanın 4-6. haftasında aşının oluşturduğu IgG sınıfı antikorlar en yüksek düzeylerine erişir.

b) Polisakkarid yapısındaki aşılar karşı TI (T-Independent) özellikte yanıt:

S.pneumoniae, *N.meningitidis*, *H.influenzae* gibi bakterilerin polisakkarid (PS) antijenleri söz konusu oldu-

ğunda, dolaşım yoluyla dalak ve lenf nodüllerinin makro-fajlarca zengin marjinal bölgelerine ulaşan antijenler, bu bölgede B lenfositleri ile ilişki kurarlar. Yinelenen yapıtaşları aracılığı ile B hücre reseptör (BHR)'lerine tutunan bu yapılar, ekstrasfoliküler bölgede B hücre aktivasyonuna yol açıp, bağışıklamayı izleyen bir hafta içinde bu hücrelerin plazma hücrelerine dönüşümlerine neden olurlar. Böylece kısmi izotip dönüşümü ve düşük afiniteye sahip antikor üretimi gerçekleşir (10). Sonuçta PS yapısındaki antijenlere özgü, düşük titrede ve bellek özelliği bulunmayan TI tipi yanıt ortaya çıkmış olur. Genel olarak somatik mutasyonların GM'de gerçekleştiği kabul edildiğinden, PS aşılama mutasyona uğramış antikor üretimi söz konusu olmaz; ancak aynı antijenler bir şekilde protein moleküllerine bağlanmış iseler, bu durumda GM yanıtının gerçekleşmesi ve bellekli hücrelerin sentezi mümkün olur. Bu gelişmede, PS uyarısı sonunda ortaya çıkan IgM⁺, IgD⁺, CD27⁺ bellekli B hücrelerinin, dalağın marjinal bölgesinde belirip dolaşıma katılmış B hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (12).

Ekstrasfoliküler ortamdaki farklılaşmalarını takiben PS'e özgül plazma hücreleri dalağın kırmızı pulpasına geçer, kısa bir süre burada kalır ve apoptoz uyarınca yıkıma uğrarlar. Belirtilen bu özellik, dalak marjinal bölgeleri henüz olgunlaşmamış olan çocuklarda bakteri PS aşılmasının yeterince immünojen olmamasını açıklamaktadır. Sonuçta bu tip bir uyarı ile oluşacak antikorların, ancak aylarla ifade edilen kısa bir zaman diliminde varlıklarını sürdürmeleri söz konusu olmaktadır ve GM aşamasını yaşamayan PS antijenlerinin bellek uyarısı yapmadıkları kabul edilir (9). İşte bu nedenle, aynı PS antijeni ile yinelenen uyarılarda ilk kez aşılansın naif bireylerde gözlenen primer yanıt tipi bir gelişme gözlenmektedir. Saf bakteri PS'leri ile protein konjugelerinin yanıt farkı ekstrasfoliküler ve GM reaksiyonlarının oluşup oluşmamasından kaynaklanmaktadır. Taşıyıcı protein molekülüne bağlanan PS modelinde özgül B hücreleri GM aşamasından geçip, taşıyıcıya spesifik Tfh hücre yardımı alırlar ve yüksek afiniteli antikor üretimi ile karakterize uzun ömürlü plazma hücreleri ve bellek hücrelerine dönüşürler.

Yaşlanma Sürecinde İmmün Sistem

Buraya dek, bir viral enfeksiyon örneğinden hareketle, immün sistemin ana hatlarından bahsedilmiştir. Peki tüm canlılar için kaçınılmaz bir gelişme olan "yaş alma" sürecinde, immün sistemde herhangi bir değişiklik olmaktadır mı? Ve hangi parametreler bu farklılaşmayı göstermektedir?

Yıllar içinde memelilerin immün sistemlerinde gözlenen "fonksiyon azalma" olgusu, çocukluk ve gençlik dönemleri ile kıyaslandığında, ileri yaşlarda aşılara yanıt oranındaki azalma ve enfeksiyon hastalıklarına duyarlılığın artması ile kendini gösterir (13). Bu gerçeğin anlaşılmasından sonra, ileri yaşlarda hangi immün mekanizmalarda ve ne oranda bir "yıpranmanın" söz konusu olduğu incelenmeye başlanmıştır. Bu konudaki bulgulara, doğal direnç parametreleri ile başlayalım: Örneğin doğal direncin harekete geçmesi için gerekli olan TLR

üzerinden sinyal iletim gücü ve proinflatuvar sitokin ve kemokin moleküllerinin üretim düzeyi ileri yaşlarda azalmaktadır (14). Bu durum sadece ilk savunma hattının zayıflamasına yol açmamakta; ayrıca özgül yanıtın uyarıcısı ve yönlendiricisi olan doğal bağışıklığın aksaması sonunda, B ve özellikle T lenfositlerinin işlevlerinde de güçsüzlükler ortaya çıkmaktadır (15). Bu arada naif B ve T hücrelerinin üretim oranları ve bellekli hücrelerin işlevsel özellikleri de zaman içinde azalmaktadır (16). İleri yaşlarda NK hücre fonksiyonları incelendiğinde ise, bu hücrelerin hem sitotoksitite kapasitelerinin, hem de sitokin üretme özelliklerinin; buna bağlı olarak diğer immünokompetan hücrelerin aktivasyonunun güçsüzeleştiği saptanmıştır (17). İleri yaşlarda B lenfositlerinin etkinliklerindeki zayıflamanın nedenleri araştırıldığında ise, intrinsek faktörlerin ve mikro çevrenin değişimine paralel olarak, plazmosit üretiminde kantitatif azalma olduğu; germinal merkezlerinin güçsüzeleşmesine bağlı olarak immünooglobülin üretiminin yavaşladığı, afinitelerinin değiştiği saptanmıştır (18).

Bu gelişmelerin olabildiğince önlenmesi için, bir çok araştırma ekibi hayvan modelleri ile çalışmalar gerçekleştirmişler ve çeşitli uygulamaların etki oranını incelemişlerdir. Örneğin kemik iliği nakli, IL-17 tedavisi, timus transplantasyonu gibi uygulamalar ile, zayıflayan özgül yanıtın ne oranda onarılabileceği araştırılmıştır. Ayrıca nöroendokrin sistemi üzerine etki için çinko ya da seks steroidleri tedavilerinin yararları incelenmiş; ve nihayet gen tedavisinin etkinliği araştırılmıştır (19). Dışardan verilecek çeşitli maddeler ile doğal süreci kısmen de olsa geciktirmenin mümkün olup olmadığını araştıran bir dizi bilim insanı, genel olarak "hormetiner" adını verdikleri bir dizi molekülün immün sistem üzerine etkilerini araştırmışlardır. Vitaminlerden antioksidanlara; eser elementlerden minerallere; ve nihayet sarımsaktan bir dizi tropikal meyveye (*Serenoa repens*, *Ginkgo biloba*, *Chamomilla recutita* gibi) kadar çok çeşitli maddenin immün sistemi güçlendirici etkisi incelenmiş ve incelenmektedir. Özellikle geleneksel Çin tıbbı ile Hindistan kökenli "ayurveda" temelli uygulamalar son yıllarda ilgi odağı olmuştur. 1990'lı yılların sonunda ise fitoestrogenler, "D-tox" diyetleri gibi farklı yaklaşımların adeta "moda" oldukları görülmektedir. Ancak günümüzde bu çalışmaların sonuçlarına bakarak bir genelleme yapmak oldukça zordur ve konu ile ilgili son sözün henüz söylenmediği kabul edilmektedir (20). Bu gerçeği göz ardı etmeksizin, düşük kalorili beslenme diyetlerine ek olarak taze meyve ve sebze tüketiminin, düzenli ve kontrollü spor yapmanın, temiz bir çevrede ve olabildiğince stressiz bir ortamda yaşamının, kısaca "sağlıklı yaşam" uygulamalarının, "yaş alma" sürecinde zayıflama eğilimi gösteren immün sistemimiz için de kanıtlanmış yararları olan uygulamalar olduğu unutulmamalıdır.

Belirtilen gelişmeler doğrultusunda, yaşlanma ile aşılara yanıtın da azaldığı; özellikle ileri yaşlarda sorun yaratabilen enfeksiyon etkenlerine karşı geliştirilen aşılardan bir yandan kullanımları önerilirken, öte yandan yaşlılarda bu aşılara karşı oluşacak yanıtın, sağlıklı genç erişkinler düzeyinde gerçekleşmediği bilinmektedir.

Kaynaklar

1. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:45-51.
2. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defence: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:189-220.
3. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:65-91.
4. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004; 5:981-6.
5. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:778-809.
6. Mahalingam S, Friedland JS, Heise MY, Rulli NE, Meanger J, Lidbury BA. Chemokines and viruses: friends or foes? *Trends Microbiol* 2003; 11:383-91.
7. Al-Daccak R, Money N, Charron D. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:108-13.
8. Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:29-70.
9. Siegrist CA. Vaccine immunology, p: 17. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P (eds), *Vaccines*. 2008, 5th ed. Saunders Elsevier, China.
10. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, et al. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 2003; 194: 8.
11. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, et al. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature Rev Immunol* 2005; 5: 853.
12. Weller S, Reynaud CA, Weill JC. Vaccination against encapsulated bacteria in humans: paradoxes. *Trends Immunol* 2005; 26: 85.
13. Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine* 2006; 24: 1159-69.
14. Van Duin D, Shaw AC. Toll-like receptors in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 1438-44.
15. Bürkle A, Caselli G, Franceschi C, et al. Pathophysiology of aging, longevity and age related diseases. *Immun Ageing* 2007; 4: 4.
16. Hakim FT, Gres RE. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens* 2007; 70: 179-89.
17. Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 2004; 3:177-84.
18. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 2007; 120: 435-46.
19. DeVeale B, Brumme T, Seroude L. Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell* 2004; 3: 195-208.
20. Rattan SI. Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* 2008; 7: 63-78.

MANTAR-KONAK İLİŞKİSİNİN ŞEKİLLENMESİNDE MOLEKÜLER GENETİK YAKLAŞIMLAR

Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Mantar enfeksiyonlarının gelişmesi için gerekli konak faktörleri bağışıklık bilimi-immünoloji altında incelenmektedir. Bağışıklık bilimi genel kavramlar kadar kişiye özel kavramları, faktörleri de incelemektedir. Son yıllarda “kişiye özel tedavi” kavramının tartışılmaya başlanmasında en önemli etkenlerden biri bağışık sistemdeki bu kişisel farklılıklardır. Sadece mantar enfeksiyonları için değil, belki de bütün hastalıklar için “hastalık yoktur, hasta vardır” söylemini doğrular şekilde, birçok kişisel faktör hastalıkların gelişimini etkilemektedir. Elimizde fazla tedavi seçeneği bulunmayan hastalıklarda kişisel faktörler çok daha fazla öne çıkmaktadır. İnvazif mantar hastalıklarının geliştiği hasta gruplarında hastanın altta yatan hastalığı, bağışıklık sisteminin durumu ve aldığı diğer tedaviler antifungal tedavinin sonuçlarını doğrudan etkilemektedir. Bir nedenle bağışıklık sistemi baskılanmış bu hastalarda çoğu kez antifungal tedaviye rağmen hastalar kaybedilmektedir.

Genetik bilimi ve aslında immüno-genetik bilimi içinde yaşanan hızlı gelişmeler, bütün hastalıklar için kişisel risk faktörlerinin varlığını önceden gösterebilme üzerinde yoğunlaşmıştır. Bütün genetik yapıyı ortaya çıkaran “ticari” yaklaşımlar ile, sağlık açısından geleceğinizi, hastalıklara yatkınlığınızı ortaya çıkardığını iddia eden testler yapılmaktadır.

“Yüzeysel bir mantar hastalığı olan onikomikozu genetik bir yatkınlık var mıdır?” sorusuna ilk kez yanıt arayan Zaitz ve arkadaşları, 1996 yılında yaptıkları çalışmada, onikomikozlu hasta grubunda HLA-DR52 bulunduğunu, onikomikoz olmayan kontrol grubunda ise aksine bulunmadığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca, sağlıklı grupta HLA-DR53 varlığını saptadıklarını belirtmişlerdir (1). Çalışma yapılan grup Brezilyalı Eşkenazi Yahudileri olarak seçildiğinden, bu farkın seçilen etnik grup ile mi ilişkili olduğu, yoksa devamında onikomikoz için bir başka genetik yatkınlığın tanımlanıp tanımlanmadığı konusu literatürde henüz açıklık kazanmamıştır. Hastalıkları sadece genetik faktörlerin değil, etnik farklılıkların, çevresel, sosyal, kültürel ve ekonomik olayların da etkilediği epigenetik kavramındaki gelişmelerden izlenmektedir. Sonraki yıllarda onikomikoz ile ilgili başka genetik faktörler, başka gruplarda incelenmiştir. Gupta ve arkadaşları 2014 yılında kısa bir derlemede, onikomikoz ile birlikteliği olan genetik faktörleri değerlendirmişlerdir (2). Bu araştırmacılar, doğal immün yanıt içinde yer alan Dektin-1 yolağı üzerinde meydana gelen herhangi bir mutasyon veya polimorfizmin, kütanöz kandidoz riskini artırdığını gösteren yayınları derlemişlerdir. Aynı derlemede doğal immünitenin bir başka elemanı olan interselüler adezyon

molekülü -1 (ICAM-1) ile kronik tırnak kandidozu arasında bir ilişki olduğu açıklanmıştır. Beş kuşağında da el ve ayak kandidozu olan Sicilyalı bir ailede düşük düzeyde ICAM-1 serum konsantrasyonlarının gösterilmesi de ilginç bir bulgudur (2).

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) insan genomunda sık görülen varyasyonlardandır. Bireyler kendi DNA dizilerinde sadece bir tek nükleotidde değişiklik gösterebilirler. Bazı SNP tipleri, ekzonlar üzerinde olduklarından aminoasit dizilerini etkilemezler; ancak diğerleri, proteinlerin değişmesine neden olabilir. En bilineninde olduğu gibi, beta-globin geninin altıncı kodonunda GTG yerine GAG geçerse, valin yerine glutamik asit kodlanır. Bu değişiklik beta-globin zincirini etkiler ve oksijen taşıma kapasitesi değişir. Nükleotid farklılığı hangi immün sistem elemanında değişiklik yapmış ise, sonuçları bu immün sistem elemanın görevlerini etkileyecektir. *Toll* benzeri reseptörler (TLR) evrimsel olarak korunmuş patojen tanıyan moleküler yapılar (PAMPs) olarak bilinirler. Örneğin TLR2 peptidoglikan için iyi bilinen bir reseptördür. TLR2 ve TLR4 mantarların tanınmasında görev alırlar. TLR yapı veya fonksiyonunda değişiklik oluşturan SNP'lerinin, *Aspergillus fumigatus* konidyalarının yakalanmasını etkilediği gösterilmiştir. Mannan bağlayan lektin (MBL) ve surfaktan proteinlerindeki polimorfizmler sonucunda *A.fumigatus* enfeksiyonlarına duyarlılık artmıştır. Farelerde tanımlanmış olan (rs36203921,1011 A/G) SNP ile allerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA) arasındaki ilişki tanımlanmıştır. Sitokinlerin yapısını değiştiren SNP de aspergilloz riskini artırmaktadır. İnterlökin 1-beta için tanımlanmış olan özel SNP'nin invazif pulmoner aspergilloz (IPA) ile ilişkisi gösterilmiştir. Bağışıklık sistemi baskılanmamış kişilerde de aspergilloza yatkınlığı artıran genetik değişiklikler tanımlanmıştır (3).

Literatürde çok sayıda monogenetik hastalık tanımlanmıştır. *CARD9* genindeki homozigot bir mutasyon sonucunda Dektin-1 proteininin kodlanması bozulmaktadır. Bunun sonucunda invazif *Candida* enfeksiyonlarına yatkınlık gösterilmiştir. Hiper-IgE Sendromu (HIES) tekrarlayan mukozal *C.albicans* enfeksiyonları ile birliktedir. HIES ile birlikte görülen başka mutasyonların, IL-17 ve IL-23 ifadesini değiştirdiği ve mukoza kandidozu riskini artırdığı gösterilmiştir (4).

Bütün bu genetik merakın tek bir sebebi bulunmaktadır; invazif mantar hastalıklarını önceden tahmin edebilir ve buna karşı önlem alabilir miyiz? Bu sorunun cevabını “evet” yönüne çevirecek kanıtların sayısı her geçen gün artmaktadır (5). Bireysel genetik eksiklikler telafi edilebilirse, teorik olarak mantar enfeksiyonlarının da önüne ge-

çilebilir. Çok sayıda yayın bu konuda kanıtlar sunmaktaysa da, bu kanıtların tekrar tekrar doğrulandığı çalışmaların ışığında, daha gerçekçi ve kesin sonuçlara ihtiyacımız olduğu açıktır.

Kaynaklar

1. Zaitz C, Campbell I, Moraes JR, et al. HLA-associated susceptibility to chronic onychomycosis in Brazilian Ashkenazic Jews. *Int J Dermatol* 1996; 35: 681-2.
2. Gupta AK, Simpson FC, Brintnell WC. Do genetic mutations and genotypes contribute to onychomycosis? *Dermatology* 2014 [Epub ahead of print] (DOI:10.1159/000358586).
3. Mezger M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to infections with *Aspergillus fumigatus*. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36: 168-77.
4. Smeekens SP, van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG. Genetic susceptibility to *Candida* infections. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 805-13.
5. Cunha C, Aversa F, Bistoni G, et al. Immunogenetic profiling to predict risk of invasive fungal diseases: where are we now ? *Immunol Invest* 2011; 40: 723-34.

8. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

Paneller

ÇOCUKLARDA İNTESTİNAL MİKROBİYOTA

Prof. Dr. Ener Çağrı DİNLEYİCİ

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir

İnsan mikrobiyotası bakteriler, viruslar, mantarlar ve protozoonlardan oluşan kompleks bir yapıdır. Bakteriler intestinal mikrobiyotanın DNA içeriği ve hücre sayısı yönünden büyük bölümünü oluşturmaktadır. Mikrobiyota üzerine yapılan son çalışmalarda bakteriler tüm mikrobiyotanın %99'unu oluşturmakta olup, 1500'den fazla farklı tür tanımlanmıştır. Bakteri yoğunluğunun büyük bölümünü; *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria* olmak üzere dört temel aile oluşturmaktadır. Çocuklarda yürütülen son çalışmada, vücudun 18 farklı anatomik bölgesinde 30 farklı bakteri ailesinin bulunduğu gösterilmiştir. Mikrobiyota kompozisyonunun, vücudun farklı anatomik bölümlerinde değişkenlik gösterdiği, benzer bakterilerin vücudun farklı bölümlerinde farklı fonksiyonlar gösterdiği bildirilmektedir.

İntestinal mikrobiyotanın çocuklarda değerlendirildiği çalışmalarda, mikrobiota üzerine birçok farklı faktörün etkili olduğu ve mikrobiyotadaki değişiklikler ile uzun ve kısa vadede birçok hastalık arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Çok yakın zamana kadar anne karnında steril olduğu düşünülen fetus ve anne sütü de dahil olmak üzere bakterilerin yer aldığı belirlenmiştir. Yenidoğan bebeklerde mikrobiyota üzerine en etkili faktörlerden biri doğum şeklidir. Normal vajinal yol ile doğan bebeklerin, ilk olarak annenin mikrobiyotası ile karşılaştığı ve laktobasillerden zengin bir mikrobiyota yapısı kazandığı saptanmıştır. Aksine sezeryan ile doğan bebeklerde, bebekte laktobasil kolonizasyonu olmadığı gösterilmiştir.

Bebeklerde intestinal mikrobiyota üzerine etkili bir diğer faktör beslenme şeklidir. Yalnız anne sütü ile beslenen bebeklerin, doğumu takip eden günler içerisinde bağırsaklarında *Bifidobacterium* ağırlıklı bir kolonizasyon olurken, formül mama ile beslenen çocuklarda *Bifidobacterium* yoğunluğunun düşük olduğu ve *Bacteroidetes* ağırlıklı bir kolonizasyon olduğu gösterilmiştir. Çocukluk çağında, yaş ilerledikçe mikrobiyota içerisindeki bakteri çeşitliliği artmaktadır. Bu dönemde intestinal mikrobiyota üzerine etkili en önemli faktör antibiyotik kullanımımızdır. Ülkemizde de dahil olmak üzere, yaygın geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılmasının, çocuklarda mikrobiyota kompozisyonunda değişikliklere neden olduğu saptanmıştır. Antibiyotik kullanımını takip eden 40 gün içerisinde, başta ishal olmak üzere gastrointestinal sisteme ait komplikasyonlar görülürken, erken çocukluk döneminde sık antibiyotik kullanımı olan çocuklarda uzun vadede obezite ve inflamatuvar bağırsak hastalığı sıklığı artmaktadır. İntestinal mikrobiyotanın, bağırsaklarda tanımlanan M hücreleri aracılığı ile immün sistem ile direkt ilişkisinin olduğunun gösterilmesi sonrası, intesti-

nal mikrobiyota değişikliklerinin sık enfeksiyon geçirme ile ilişkisi olduğunu destekleyen birçok çalışma yayınlanmıştır. Çocuklarda akut enfeksiyöz ishal, antibiyotik ile ilişkili ishal, nekrotizan enterokolit, infantil kolik, irritabl bağırsak sendromu başta olmak üzere birçok hastalıkta, mikrobiyota kompozisyonunda kısa ya da uzun süreli değişiklikler olduğu gösterilmiştir.

Çocuklarda, başta akut enfeksiyöz ishallerde olmak üzere probiyotiklerin kullanılmasının olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde prospektif, randomize kontrollü çok merkezli PROBAGE çalışması kapsamında, 1500'e yakın çocukta probiyotiklerin akut enfeksiyöz ishaldeki etkinliği değerlendirilmiş ve içerdiği suş ve dozu belirlenmiş probiyotiklerin ishal süresinde ve hastanede yatış süresinde kısalma sağladığı gösterilmiştir. ESPID/ESPGHAN 2014 rehberi, Amerikan Pediatri Akademisi ve Yale Probiotics Working Group, çocuklarda akut enfeksiyöz ishallerde hastalığın erken tedavisinde uygulanacak probiyotik tedavisinin (*Lactobacillus GG*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus reuteri DSM 17938*) ishal süresinde kısalma sağladığını açıklamışlardır. Benzer şekilde, antibiyotik tedavisi ile aynı anda başlanılan probiyotik tedavisinin, antibiyotik ile ilişkili ishal sıklığında belirgin azalma sağladığı bildirilmektedir. İnfantil kolik olgularında *Lactobacillus reuteri* kullanımı ile ağlama epizodlarının kısaldığı gösterilmiştir. Bu bulguyu destekler biçimde, doğar doğmaz *Lactobacillus reuteri DSM 17938* başlanan yenidoğanlarda, plasebo tedavisi alan gruba göre infantil kolik sıklığı belirgin olarak azalmaktadır.

Çocuklarda probiyotik kullanımının, çocukluk çağı üst solunum yolu enfeksiyonlarının sıklığında da azalma sağladığını gösteren ümit verici çalışmalar bulunmaktadır. Çocukluk çağı alerjik hastalıkları ve astımı ile ilgili probiyotiklerin etkisi ile birçok çalışma yapılmış; çalışmalarda probiyotiklerin etkili ya da etkisiz olduğunu gösteren farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, intestinal mikrobiyota ve probiyotiklerin çocukluk çağındaki etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yayınlanmış olup, birçok yeni alanda çalışmalara devam edilmektedir. Ülkemizde probiyotiklerin etkileri ile ilgili yapılan klinik çalışmaların yanı sıra, intestinal mikrobiyota kompozisyonunun değerlendirildiği çalışmalar yol gösterici olacaktır.

Kaynaklar

- Dinleyici EC, Dalgic N, Guven S, et al. The effect of a multispecies synbiotic mixture on the duration of diarrhea and length of hospital stay in children with acute diarrhea in Turkey: single blinded randomized study. Eur J Pediatr 2013; 172(4):459-64.

- Dinleyici EC; PROBAGE Study Group, Vandeplass Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 effectively reduces the duration of acute diarrhoea in hospitalised children. *Acta Paediatr* 2014 [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/apa.12617.
- Esposito S, Rigante D, Principi N. Do children's upper respiratory tract infections benefit from probiotics? *BMC Infect Dis* 2014; 14:194.
- Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Vecchio AL, Shamir R, Szajewska H. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases Evidence-based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe: Update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014. [Epub ahead of print]
- Guarino A, Wudy A, Basile F, Ruberto E, Buccigrossi V. Composition and roles of intestinal microbiota in children. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25 Suppl 1:63-6.
- Ismail IH, Licciardi PV, Tang ML. Probiotic effects in allergic disease. *J Paediatr Child Health* 2013; 49(9):709-15.
- Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (11):CD004827.
- Thomas DW, Greer FR; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* 2010; 126(6):1217-31.
- Vandeplass Y, De Greef E, Devreker T, Veereman-Wauters G, Hauser B. Probiotics and prebiotics in infants and children. *Curr Infect Dis Rep* 2013; 15(3):251-62.
- Weber TK, Polanco I. Gastrointestinal microbiota and some children diseases: a review. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012:676585.

ERİŞKİNLERDE MİKROBİYOTA

Doç. Dr. Tarkan KARAKAN

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara

Insan gastrointestinal sisteminde kompleks ve oldukça değişken bir mikrobiyal topluluk bulunmaktadır. Barsaklarımızda 1000 bakteriyel suş ve insandaki gen sayısının 100 katı gen bulunur. Ayrıca insan vücudundaki hücre sayısının 10 katı bakteri barsaklarımızda bulunmaktadır. Bu nedenle barsak mikrobiyotasına “gizli metabolik organ” denilebilir. Bu kadar büyük bir metabolik topluluğun (metabolizmanın) konakçının (insan) sağlık ve hastalığına etkisi son dekada kadar pek araştırılmamıştır. Gelişen moleküler tanısal yöntemler sayesinde her geçen gün bu alanda yeni keşifler yapılmaktadır.

Erişkin mikrobiyotası çocuklardan farklı olarak çok fazla değişiklik göstermez. Ancak hastalık durumlarında dominant bakteri toplulukları değişebilir ve özellikle “değişkenliği” azalabilir. Sağlıklı mikrobiyotanın ne olduğu henüz tartışma konusu olmakla beraber, sağlıklı kontrollerle yapılan çalışmalarda hastalık durumunda oluşan “sağlıksız” mikrobiyotaya “disbiyozis” terminolojisi kullanılmaya başlanmıştır. Sağlıklı mikrobiyotaya ise “öbiyozis” denilmektedir. Barsak mikrobiyotası üzerinde değişiklik yapmayı hedefleyen tedaviler ise “bakteriyoterapi” veya “barsak mikrobiyota modülasyonu” adını almaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemler; probiyotikler, prebiyotikler, antibiyotikler ve son yıllarda gelişmekte olan “fokal mikrobiyota transplantasyonu”dur.

Disbiyozis olduğu bilimsel olarak kanıtlanmış klinik durumlar ise; allerjik ve atopik hastalıklar, çölyak hastalığı, kolon kanseri, HIV enfeksiyonu, inflamatuvar barsak hastalığı, irritable barsak sendromu, obezite, romatoid artrit, diyabetes mellitus Tip 1 ve 2, nekrotizan enterokolit ve otizm olarak sayılabilir. Bu hastalıklara her gün bir yenisi eklenmektedir.

Disbiyozis ve barsak mikrobiyota modülasyonu henüz emekleme döneminde olan klinik durumlardır. Ancak potansiyel olarak, gelecekte hem tanısal (hastalıkların tanısı ve prognozunu tayin etmekte) hem de tedavide kullanılacağı tahmin edilmektedir. Fokal mikrobiyota transplantasyonu ise FDA tarafından “ilaç” kategorisinde ele alınmaya başlanmış ve faz çalışmaları yapılması zorunluluğu getirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde artifisiyel mikrobiyota süspansiyonları üretme proje çalışmaları devam etmektedir.

Günümüzde mikrobiyota ile ilgili cevaplanması gereken birçok soru vardır. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Sağlıklı mikrobiyotanın tanımı nedir?
- Bakterilerin türü ve sayısı mı, yoksa fonksiyonları (metabolomiks) daha önemlidir?

- Bakteriyoterapi hangi bakteri kombinasyonları idealdir? Bakteri-bakteri etkileşimi nasıldır?
- Bakteri dışındaki virus ve mantar topluluklarının rolü nedir?
- Bakteriyoterapi sürekli mi yoksa birkaç seans mı yapılmalıdır?
- Toplumsal, kültürel, coğrafik farklılıklar mikrobiyotayı etkilemekte midir?

Gelecekte kronik inflamatuvar hastalıklar başta olmak üzere birçok alanda mikrobiyota adından söz ettirecek gibi görünmektedir. En ilginç alanlardan biri de muhtemelen psikiyatrik hastalıklarla (kognitif işlevler, panik atak, anksiyete, depresyon, vb) mikrobiyota ilişkisi olacaktır (barsak-beyin eksen). Bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Kaynaklar

- Biagi E, Candela M, Turrone S, Garagnani P, Franceschi C, Brigidi P. Ageing and gut microbes: perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacol Res* 2013; 69(1):11-20.
- Bonfrate L, Tack J, Grattagliano I, Cuomo R, Portincasa P. Microbiota in health and irritable bowel syndrome: current knowledge, perspectives and therapeutic options. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48(9):995-1009.
- Cammarota G, Ianiro G, Bibbò S, Gasbarrini A. Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? *Intern Emerg Med* 2014 Mar 25. [Epub ahead of print]
- D’Aversa F, Tortora A, Ianiro G, Ponziani FR, Annicchiarico BE, Gasbarrini A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *Intern Emerg Med* 2013; 8 Suppl 1:S11-5.
- Konkel L. The environment within: exploring the role of the gut microbiome in health and disease. *Environ Health Perspect* 2013; 121(9):A276-81.
- Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2014; 146(6):1500-12.
- Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:104.
- Robles Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr* 2013; 109 Suppl 2:S21-6.
- Shen D, Liu C, Xu R, Zhang F. Human gut microbiota: dysbiosis and manipulation. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:123.
- Smits LP, Bouter KE, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* 2013; 145(5):946-53.
- Winter SE, Bäuml AJ. Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. *Gut Microbes* 2014; 5(1):71-3.
- Young VB. The intestinal microbiota in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28(1):63-9.

MİKROBİYOTA VE EPİGENETİK

Prof. Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Insan mikrobiyotası, büyük çoğunluğu bakteriler olmak üzere 10^{14} kadar mikroorganizmadan oluşmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası ise bunun %70 kadarını oluşturmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasındaki düşük moleküler ağırlıklı birçok madde, insan genomunun tekrar programlanması ve post-translasyonel modifikasyonlardan sorumlu epigenomik mekanizmalarda aktif olarak yer almaktadır. Birçok biyojenik ve abiyojenik etken ve faktörün neden olduğu bağırsak mikrobiyotik dengesizlikleri, farklı epigenetik anomalilere ve ilişkili metabolik hastalıkların başlaması ve ilerlemesine yol açar (1).

Epigenetik DNA'nın nükleotid dizilerindeki değişiklikleri içermez. Epigenomik etkiler, farklı kimyasal grupların DNA, kromatin, histonlar ve diğer proteinlere post-translasyon döneminde kovalent bağlanmaları ile ilişkilidir. Bunlar, DNA ve histon metilasyonu, asetilasyon, fosforilasyon, ADP ribozilasyon, tekrarlayan indükleyen gen susturma, miRNA interferensleri, genomik *imprinting* gibi etkilerdir (2). İnsan epigenetiği çeşitli monogenik ve multifaktöriyel hastalıkların (metabolik sendrom, tip II diyabet, şizofreni, otoimmün hastalıklar, kanser, otizm gibi) bazı özelliklerini açıklayabilir. Epigenetik kod kişisel olduğu gibi doku ve hücreye özgül olabilir ve yaşlanma, hastalık, çevresel faktörler ve etkenlerle değişebilir. Uzun yıllar hastalık ve sağlığın kazanılmış genetik değişiklikler sonucu olduğu düşünülmüştür. Günümüzde fenotipin, genotip, epigenom ve çevresel ilişkilerin kompleks sonucu olduğu açığa çıkmaktadır (3-5).

Epigenetik belirli genlerin ne zaman ve nasıl açılıp kapandığının regüle edildiği üzerine odaklanırken, epigenomik hücre ve organizmadaki birçok gendeki epigenetik değişiklikleri analiz eder. Modern tıpta epigenetik merkez üssü gibi algılanmaktadır, çünkü kişi genotipi ve çevre ilişkilerini açıklamaya yardımcı olur ve epigenetik mekanizmalardaki karışıklık çeşitli sağlık değişikliklerine yol açmaktadır.

Yüksek ökaryotik organizmalarda (gen ekspresyon regülasyonu, hücre proliferasyonu, hücre stres olayları, yaşlanma ve DNA onarımı, yaşam boyu döngüsel değişiklikler, mitoz ve apoptoz arası denge, bakteriyel ve konak hücre haberleşme gibi) hücre genomunun epigenomik tekrar programlanması ve gen ekspresyonlarının post-translasyonel modifikasyonları gelişme, rejenerasyon ve post-natal yaşam için esansiyel mekanizmalardır (3,4). Bakterilerde de herşey (gen regülasyonu, insan ve hayvan patojenlerindeki virülans, DNA replikasyon zamanlaması, DNA tamiri gibi) aynı ökaryotlardaki gibidir (5).

Epigenetik DNA ve kromatin değişiklikleri, bir hücre bölünmesinden diğerine kadar kalıcı olup birçok hücre

jenerasyonunda görülebilir. Hücre sıvılarında epigenomik süreçlerle ilişkili metillenmiş DNA, asetillenmiş proteinler, miRNA, özgül substratlar, kofaktörler, biyokimyasal reaksiyonlarda yer alan enzimler bazı metabolik hastalıkların saptanmasında biyobelirleyici olabilir (3,6).

Günümüzde birçok yiyecek içeriği, ilaçlar, çevre kirliliğine yol açan madde, gen ürünlerinin post-translasyonel modifikasyonu ve epigenomik gen regülasyonuna katılır (3,8). Belirli enfeksiyöz etkenler de (Epstein-Barr virusu, Hepatit B ve C virusu, insan papilloma virusları, poliovirusu, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Campylobacter rectus*, *Helicobacter pylori* gibi) bazı metabolizma ile ilişkili hastalıklarda, özellikle kanser başlangıç ve progresyonunda konaktaki epigenetik değişikliklere katkıda bulunmaktadır (8). Bağırsak mikrobiyotasının epigenetik modifiye edici faktör rolü, metabolik sendrom veya ilişkili hastalıklarda gözlenmektedir (9). Biyotik ve abiyotik sinyaller etki azaldıktan sonra gen ekspresyonunda değişiklikler oluşturabilir.

Simbiyotik mikroflorayla ilişkili post-translasyonel moleküler mekanizmalar ve epigenomik tekrar programlama tam anlaşılmamıştır. Farklı mikrobiyal moleküllerin analizi, bağırsak endojen mikrobiyotasının epigenomik mekanizmalar ve ilişkili metabolik hastalıkların başlaması ve gelişmesindeki epigenetik anormallikler ve bağırsak mikrobiyotik dengesizlik sonuçlarındaki rolünü değerlendirmemize yardımcı olacaktır (10).

Günümüzde "omik" esaslı çalışmalar, endojen mikrobiyotanın (probiyotikler dahil) gastrointestinal sistemde çevreye adaptasyon, gen ekspresyonunun regülasyonu, son ürünlerdeki genlerde saptanan post-translasyonel modifikasyonların anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Endojen mikrobiyotanın vücutta hızlıca yayılarak farklı hücre, doku, organ hedefleri ile etkileşen birçok düşük moleküler ağırlıklı madde ürettiği bilinmektedir. Bunların çoğu konak metabolizmasında genomik ve epigenomik süreçlere karışabilmektedir. Bu mikrobiyal düşük molekül ağırlıklı moleküllerin bazıları, yaşam boyu insan genlerinin ekspresyonunu regüle eden endojen çevresel anahtar faktörlerdendir (11).

Konak epigenomik değişiklikleri üzerine etkili bazı bağırsak kaynaklı düşük molekül ağırlıklı moleküller (1) aşağıda belirtilmiştir:

- Proteinler, peptidler, polisakaridler, endotoksinler, lektinler
- Basit biyokimyasal gruplar (metil-, asetil), bileşikler (biotin, betain, metiyonin, lizin, arjinin, serin, treonin, asetat, butirat, proionat, adenozin, sitozin)

- Çeşitli enzimler (metiltransferazlar, asetiltransferazlar, BirA ligaz, fosfortransferaz, kinazlar, sentetazlar)
- Ko-faktörler (folik asit, B12, B6, B2, kolin, nikotinik asit, NAD, koenzimA) ve sinyal molekülleri (hormon benzeri maddeler, inositol trifosfat)
- Epigenomik düzenlenmede rol alan enzimlerin aktivatör ve inhibitörleri (butirat, propionat, spermidin, sulforafan sistein)

Mikrobiyal sinyalin yoğunluğu ve ilişkili gen yanıtı, belirli endojen intestinal mikroorganizmaların sayısı ve kompozisyonu ile değişir. Yetersiz diyet ve/veya mikroorganizma metil grubu ve kofaktör sağlama tek-karbon metabolizmasını değiştirir ve birçok önemli epigenomik ilişkili yolakta hipometilasyona yol açar. Bu değişiklik DNA metilasyonunu bozar ve plazma homosistein konsantrasyonlarında yükselmeye, S-adenozin metiyonin içeriğinde azalmaya neden olur; tüm bu metabolik değişiklikler de çeşitli koroner, serebral, hepatik, vasküler hastalıklar ve kanser riskinin artmasına yol açar (12-16).

Bütirat ve propionat, histon deasetilaz enzimlerini inhibe eder ve özgül genlerin ekspresyonunu NAD-bağımlı protein deasetilazın aktif kısmında konformasyonel değişiklikler oluşturarak değiştirir (17,18). Mikroorganizma kaynaklı bütirat, fizyolojik konsantrasyonlarda hücre döngüsünü durdurarak apoptozisi tetikler ve konak gen ekspresyonunda kolonik epitel NAD-bağımlı protein deasetilaz inhibisyonu yapar veya miRNA ekspresyonunu azaltır (19). Bu sonuçlar bağırsak homeostazı ve karsinogenez mekanizmalarının anlaşılması için önemlidir (17,18).

Hamile kadınlarda endojen bağırsak ve vajen mikrobiyotasından üretilen birçok düşük moleküler ağırlıklı metabolitler ve sinyal molekülleri, plasenta yoluyla fetusa geçerek kognitif fonksiyonlar, metabolizma ve programlama gelişimi üzerine natal ve postnatal dönemlerde yaşam boyu genlerin epigenomik aktivasyonu veya baskılanmasına neden olur. Hamilelik döneminde probiyotik prebiyotiklerle bağırsak mikrobiyota restorasyonu önem taşır (20).

Mikrobiyota-bağırsak-beyin aksı ise son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan bir konudur. Otizm ve bağırsak mikrobiyomundaki değişiklikler dikkat çekicidir. Otistik bireylerde gastrointestinal distress yaygınlığı bu bağlantıyı destekler gözükmektedir. Bağırsak bakterisi içermeyen farelerdeki sosyal defektler ve tekrarlayan davranışlar otistik kişilerdekine benzerlik göstermektedir. Bunu ötesinde farelere in utero özgül bir probiyotik verilmesi, farelerde gözlenen bazı davranış değişikliklerinin geri dönmesine yol açmaktadır. Bağırsak mikroorganizmaları tarafından üretilen kimyasalların beyindeki epigenetik regülasyonu etkilediği ve bu değişikliklerin nöronal gen ekspresyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Bu epigenetik mekanizmaları hedefleyen probiyotik esaslı tedavilerin beyin fonksiyonlarını etkileyebileceği yeni bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (21).

'İnsan Bağırsak Mikrobiyotası ve Epigenomik' uluslararası projesini oluşturmanın gerekliliğini vurgulayan bilim insanları, insan mikrobiyal ekolojisi, beslenme, metagenomik, epigenomik ve metabolomik araştırmaların yanı sıra hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesine ilişkin interdisipliner yaklaşımların önemi üzerinde durmakta-

dır. Omik teknolojiler ve gnotobiyotik yaklaşımları insan epigenomiklerinde simbiyotik mikrobiyotanın küçük metabolik ve sinyal moleküllerinin rolünün tanımlandığı yeni bir çağı açabileceğini ortaya koymaktadır.

Kaynaklar

1. Shenderov BA. Gut indigenous microbiota and epigenetics. *Microb Ecol Health Dis* 2012; 23:17195.
2. Ekmekci A, Yalınay Çırak M. Nutrigenomics Nutrigenetics, pp: 457-70. In: Yildiz F (ed), *Advances in Food Biochemistry*. 2009. CRC Press, Taylor and Francis Group, USA.
3. Feinberg AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 2008; 299: 1345-50.
4. Farrow RE, Christiansen B, Feldman MW. Environment sensitive epigenetics and the heritability of complex diseases. *Genetics* 2011; 189: 1377-87.
5. Tollefsbol TO. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*. 2010, Academic Press, London.
6. Qureshi SA, Bashir MU, Yaqinuddin A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. *Int J Surg* 2010; 8: 194-8.
7. Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol* 2010; 44: 71-81.
8. Paschos K, Allday MJ. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2010; 18: 439-47.
9. Dumas ME, Barton RH, Toye A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12511-6.
10. Nagy-Szakal D, Kellermayer R. The remarkable capacity for gut microbial and host interactions. *Gut Microbes* 2011; 2(3):178-82.
11. Licciardi PV, Wong SS, Tang ML, Karagiannis TC. Epigenome targeting by probiotic metabolites. *Gut Pathog* 2010; 2(1):24.
12. Martin FP, Sprenger N, Montoliu I, Rezzi S, Kochhar S, Nicholson JK. Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabonomics. *J Proteome Res* 2010; 9(10): 5284-95.
13. Stead LM, Brosnan JT, Brosnan ME, Vance DE, Jacobs RL. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 5-10.
14. Jacob RA. Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 903-4.
15. Luckey D, Gomez A, Murray J, White B, Taneja V. Bugs & us: the role of the gut in autoimmunity. *Indian J Med Res* 2013; 138(5):732-43
16. Haemer MA, Huang TT, Daniels SR. The effect of neurohormonal factors, epigenetic factors, and gut microbiota on risk of obesity. *Prev Chronic Dis* 2009; 6(3): A96.
17. Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition* 2010; 26: 653-61.
18. Dashwood RH, Myzak MC, Ho E. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis* 2006; 27: 344-9.
19. Hu S, Dong TS, Dalal SR, et al. The microbe-derived short chain fatty acid butyrate targets miRNA-dependent p21 gene expression in human colon cancer. *PLoS One* 2011; 6: e16221.
20. Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet* 2005; 14 Spec No 1: R139-47.
21. Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. Microbial genes, brain & behaviour: epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes Brain Behav* 2014; 13(1):69-86.

MİKROBİYOTANIN EN ETKİLİ ANALİZİ: YENİ NESİL DİZİLEME SİSTEMLERİ

Doç. Dr. Barış OTLU

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Moleküler biyolojik tekniklerdeki gelişmeler, geleneksel mikrobiyoloji uygulamalarında köklü değişikliklere yol açmıştır. Özellikle 16S rRNA dizileme, tüm genom dizilemesi ve metagenomik çalışmaların başlaması ile mikroorganizmaların olağanüstü çeşitliliği ve onların geniş genomik repertuarları incelenmeye başlanmıştır. 16S rRNA dizileme insan mikrobiotasını araştırmak için kullanılan ilk moleküler tekniktir. Ancak kompleks biyolojik bir yaşam sistemindeki her bir canlının tanımlanması ve miktarlarının belirlenebilmesi için yeterli değildir. Bu şekildeki metagenomik çalışmalara imkan sağlayan anahtar teknolojilerin başında, daha uzun ve daha doğru DNA dizi analizi tekniklerinin geliştirilmesi gelmektedir. İlk deneysel DNA dizileme çalışmaları, Watson ve Crick tarafından DNA'nın çift zincirli yapısının ortaya konmasından yaklaşık 15 yıl sonra (1968) başlamıştır. Mikrobiyota çalışmalarının hızlanması için gerekli olan, tüm genom, "shotgun" ve "de nova" dizilemenin geliştirilmesi için ise 50 yıl daha beklenmesi gerekmiştir. Bu gecikmenin nedenlerinin başında, tüm genom dizilemesinin ve metagenomik çalışmaların yaklaşılamaz bir hedef olarak düşünülmesi gelmektedir. Ancak mikroelettronik ve yazılım alanındaki gelişmelerle birlikte insan genom projesinin başlaması bu alandaki itici güç olmuştur.

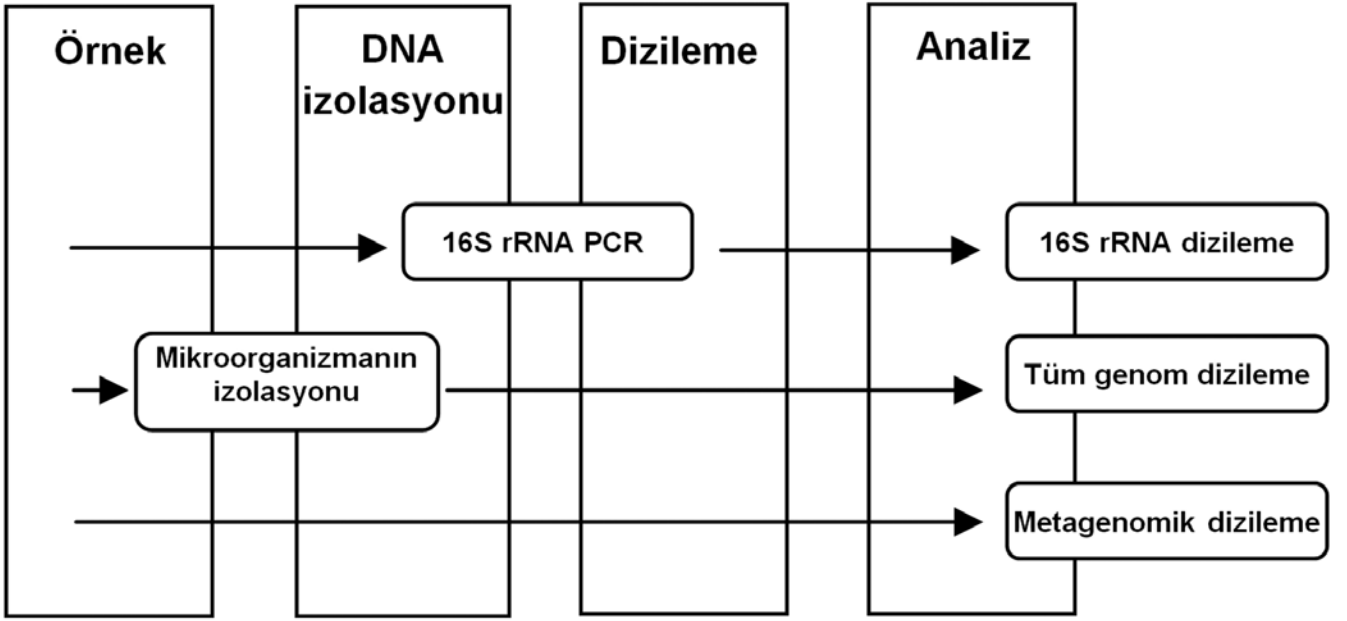
Tüm genom dizileme çalışmalarına oldukça kısa olan bakteriyofaj genomlarının dizilemesi ile başlanmıştır. İlk kez 1995 yılında Craig Venter ve "Institute for Genomic Research" (TIGR) tarafından *Haemophilus influenzae* ve *Mycoplasma genitalium*'un tüm genom dizilemesinin yapıldığı duyurulmuştur. Bu dizileri elde etmek için yapılan çalışmalar, metagenomik çalışmalara temel oluşturacak bazı yeni biyolojik yaklaşımların geliştirilmesini sağlamıştır. Bunlardan biri; *H.influenzae*'nin tüm genom dizilemesi sırasında, sonradan oldukça önemli olacak "whole genome shotgun" (tüm genom saçma yöntemi) dizileme yönteminin tanıtılmasıdır. Bu ismin verilmesinin nedeni, av tüfeğinden çıkan saçma parçaları gibi, tüm genomun önce parçalara ayrılması ve ardından her birinin tek tek dizilenmesidir. Ancak tesadüfi olarak oluşturulan bu her bir DNA parçasının, birbirinden ayrı bir şekilde dizilebilmesi için seçilebilmesi gerekmektedir. Bu yüzden de dizilenecek DNA parçasının bir plazmide aktarılarak bir alıcı hücreye (örneğin; *E.coli*'ye) klonlanmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu aşamadan sonra, klonlardaki kısa DNA parçalarının dizilenmesi ve okunan dizilerin bilgisayar programı yardımıyla birbirini tamamlayacak şekilde hizalanarak, tüm genom dizisi biraraya getirilmiştir. Sanger ve arkadaşları bu yöntemi daha önce (1982) bir lambda fajının (48.5 kb) dizilemesini yaparken kullanmışlar, an-

cak *H.influenzae* genomu gibi büyük bir DNA'nın (1.83 Mb) dizilmesinde ilk kez uygulamışlardır. Bu çalışmaların diğer bir önemli çıktısı da, TIGR tarafından geliştirilen ve okunan kısa DNA dizilerini hizalayarak birleştiren, ilk derleyici bilgisayar programının (TIGR Assembler) tanıtılması olmuştur.

Tüm bu gelişmeler öncülüğünde, hastalıkların genetik temelini anlamak ve genomdan bir taslak dizisi elde etmek amacıyla, 1990 yılında insan genom projesine başlanmıştır. İnsan genom projesi ile birlikte, bu büyüklükte bir genomu dizileyebilecek uygun teknolojilerin geliştirilmesinde büyük bir ivme yaşanmıştır. İlk otomatize dizileme cihazı *ABI Prism 310*, 1996 yılında Celera tarafından tanıtılmıştır. Ancak geliştirilen en kritik sistem, yeniden kullanılabilir kapilleri bulunan ve 96 numuneyi 3 saatte çalışabilen *ABI Prism 3700* otomatik dizileme cihazıdır. Her biri günde 650.000 baz çifti dizileyebilme kapasitesine sahip bu cihazlar şu an için Sanger'in dizileme yöntemini kullanan ve otomatik floresan dizileme özelliğine sahip birçok cihaz içerisinde öne çıkmış bir sistemdir. Bu projenin tamamlanması postgenomik alanın başlangıcını oluşturmuş ve sistem biyolojisi yaklaşımında yeni çığır açmıştır. Tüm bunların yanında, dizileme teknolojileri ile ilgili yeni yaklaşımlara ihtiyaç olduğunun fark edilmesine ve birçok yeni fikrin doğmasına da neden olmuştur. Düşük masraflı ve daha uzun DNA dizilemesi yapan yöntemlere olan ihtiyaç, "yüksek hacimli dizileme" (*massive parallel sequencing*) teknolojilerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Dizileme sürecinin paralelleştirilerek, binlerce hatta milyonlarca dizinin aynı anda üretildiği bu sistemler, "yeni nesil dizileme teknolojileri" (*next generation sequencing*) olarak adlandırılmaktadır. Bu dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukta ve hızda dizileme yapılabilmektedir. Özellikle tüm genom dizileme için geliştirilen bu sistemler 2005 yılından itibaren giderek popüler olmaya başlamışlardır. Bu sistemlerin sağladığı en önemli avantajlardan biri de genomu bilinmeyen bir canlının genom dizisinin ortaya çıkarılabilmesidir (De Nova dizileme).

İlk yeni nesil dizileme cihazları

Yeni nesil dizileme cihazlarını ticari olarak üreten ilk firma şu an *Roche Applied Science*'a bağlı olan 454 Life Sciences firmasıdır. Bu sistemde, Sanger dizileme yönteminden farklı olarak 1996 yılında Mostafa Ronaghi and Pål Nyrén tarafından tanıtılan "pirodizileme" (pyrosequencing) reaksiyonu kullanılmaktadır. Pirodizileme, DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim olan lüsiferaz aracılığıyla tespitine dayanmaktadır. Bu yeni yöntemde bir yağ solüsyonu içindeki su damlacık-



Şekil. 16S rRNA, tüm genom ve metagenomik dizilemenin basamakları (10 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

larında yer alan DNA, yağ damlacıkları içindeki boncuklar üzerinde çoğaltılır (emülsiyon PCR). Her damlacıkta tek bir primer kaplı boncuğa bağlanmış tek bir DNA kalıbı vardır ve her bir damlacık çoğalma sonucu klonal bir koloni oluşturur. Çoğalan DNA bölgesi ile birlikte bulunan boncuklar santrifüj ile plak tabanına çöktürülür. Pikrolit plaktan yeni sentezlenen DNA ayrılır. Boncuk bağlı PCR ürünü ile gerçekleştirilen dizileme yöntemi pirosekanslama olarak adlandırılır. Bu tarz dizileme yönteminde DNA polimeraz ile çoğalan DNA ipliğine eklenen her bir baz ışık saçmaktadır. Bu saçılan ışıkları hassas bir kamera kaydetmektedir. Hedef DNA, pikrolit plak kuyucuğunda sınırlı olduğundan bir seferde tek baz eklenmesine bağlı olarak kuyucuklarda çıkan ışığı ilişkilendirmek kolaydır. Bu, daha sonra her bir konumda ışık emisyonu arasında bir model elde etmek için birçok kez tekrarlanır. Sonra bir bilgisayar bu verileri okuyup özel dizileme bilgilerine dönüştürür. Orijinal 454 dizi analizörü her okumada 200 baz ya da her 12 saatlik çalışma başına toplamda 20 megabaz olacak şekilde 100.000 baz çiftinden fazla okuma yapabilmektedir. Bu sistemin 2007'de tanıtımının yapılmasından sonra cihazda şaşırtıcı yenilikler yapılmıştır. Bu yeniliklerden biri, kuyucuk sayısı artırılmış pikotitre plaklarıyla 500 baza kadar okuma yapılabilmesidir. Yeni bir cihaz olan Genome Sequencer FLX (GS FLX) Titanium, 8 saatlik tek okumada 500 milyon baz dizilebilmektedir. Sistemin eksik özelliği ise uzun homopolimerlerle karşılaştığında (segment DNA'da aynı bazın çalışması) hatalı okuma yapmasıdır.

Ticari olarak geliştirilen ikinci yeni nesil dizileme cihazı, 2006 yılında Solexa (Illumina tarafından 2007 yılında satın alınmıştır) tarafından geliştirilen *Genome Analyzer* (GA) sistemidir. Bu sistemde yüksek hacimli DNA dizilemesi için tamamen farklı bir strateji kullanılır. Tüm reaksiyon mikroskop slaytına benzer katı bir fazda

gerçekleştirilir. Öncelikle DNA fragmentleri, katı yüzey üzerine sabitlenmiş primerlere bağlanıp çoğaltılır. Küme olarak adlandırılan çoğalmış fragmanlar içeren slayt, GA cihazına yüklenir ve tekrarlayan döngüler içinde 4 farklı nükleotid tek seferde slayt üzerine eklenir. Bu reaksiyonda da kullanılan nükleotidlerin 3' OH uçları kimyasal olarak kapatılmış olduğundan zincir sonlanmasına neden olur. Pirodizilemeden farklı olarak, DNA her seferinde bir nükleotid uzar ve ardından bağlanmayan nükleotidler yıkama ile ortamdaki uzaklaştırılır. Floresan işaretli nükleotidler hassas bir kamera aracılığıyla tespit edildikten sonra nükleotidlerin 3' ucundaki sonlandırıcı, kimyasal bir reaksiyon ile uzaklaştırılır ve sonraki siklus başlatılır. Bu şekilde katı yüzeyden yukarı doğru olarak nükleotidler teker teker dizilenir. Sonlandırıcı moleküller, iki ardışık bazın aynı reaktif döngüsüne eklenemeyecek şekilde tasarlanmıştır. Bu yöntem, GS FLX dizileme platformunda karşılaşılan homopolimer problemini ortadan kaldırmaktadır.

İlk nesil GA sistemi, toplam bir gigabaz DNA dizisini oluşturmak için 40-50 milyon dizi içeren slaytla 3-4 günde analiz yapabilmekteydi. *Genome Analyzer* dizileme analizöründe iki ana sınırlama mevcuttur. Bunlar cihazın yavaş olması ve dizileyebilme uzunluğunun 35 baz çiftinden kısa olmasıdır. Sistemdeki diğer bir problem ise bu dizileme platformu için hata oranının GS FLX dizileme platformundan daha yüksek olması ve hatalı okuma sıklığının DNA dizi sonlarına doğru artmasıdır. Bu platformda özellikle referans genomda uygun bölgeye kısa dizileri eşleştirmek daha zor olduğundan kısa okuma süresi uyum sorunu daha karmaşık hal almıştır.

Illumina tarafından geliştirilen yeni nesil dizileme platformlarının en yenisi ise HiSeq 2000'dir. Bu sistem GA'nın yerini almıştır ve 2010 yılının ikinci baharında ticari olarak satışa sunulmuştur. Ticari olarak kullanılabilen üçüncü dizileme platformu, 2008 yılında Applied Biosci-

ences/Life Technologies tarafından üretilen SOLID sistemidir. Örneğin hazırlık aşamaları, hedefin klonal (küme) olarak çoğaltılması ve emülsiyon PCR basamakları 454 sistemine oldukça benzerlik göstermektedir. Bu yöntemde de, adaptör bağlı DNA parçaları, boncuklar üzerinde yakalanarak dizileme primerleri kullanılarak emülsiyon PCR ile çoğaltılır. Bu dizileme yönteminde diğerlerinden farklı olarak, çoğalmış DNA, boncuklardan saflaştırılarak slayt yüzeyine kovalent olarak bağlanır. Sentezlemeyle dizileme prosedürüne sahip bu sistemin bir diğer önemli bir farkı da, dizilime sırasında DNA ligaz enziminin kullanılmasıdır. Bu yöntemde floresan işaretli oligonükleotidler, hedef DNA molekülüne bağlanır ve DNA ligaz enzimi tarafından zincire dahil edilir. Bu eklenen probun 5'-P ucunda floresan işaretli kısmı yapıdan ayrılır ve kendinden sonra gelecek işaretli probun bağlanması için hazır hale gelir. Bu teknolojiye en yeni yöntem ise prob bağlanma işleminin iki oligonükleotid tarafından kontrol edilmesidir. Bu metod, sentezleyerek dizileme yaklaşımına göre belirleyici şekilde yüksek özgüllük ve yüksek doğruluk göstermektedir.

Life Technologies firması yaptığı yeniliklerle emülsiyon PCR aşamasını otomatize hale getiren ve kısa sürede bitmesini sağlayan üç küçük cihaz piyasaya sunmuştur. 2010 yılında yeni geliştirilen SOLID 4hq cihazı 14 günde 300 gigabaz okuma yapabilmektedir ve tek genom maliyeti yaklaşık 3000 dolardır. Sonraki araştırmalarda slaytlardaki boncuk yoğunluğu ve dizi okuma uzunlukları artırılarak daha etkili dizileme sağlanacaktır.

Herhangi bir optik okuma veya floresan ışımının yer almadığı bir sistem olan "İyon Torrent" 2010 yılında tanıtılmış, diğerlerinden oldukça farklı bir sistemdir. İyon yarı iletken dizilemesine dayalı bu dizileme yöntemi, DNA'nın polimerizasyonu sırasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının tespitine dayalıdır. Dizilenecek bir kalıp DNA ipliğini içeren bir mikro kuyucuk her seferinde tek bir nükleotid ile reaksiyona sokulur. Eğer eklenen nükleotid uzayan zincire dâhil edilebiliyorsa bu bir hidrojen iyonunun salınmasına yol açar ve bu da çok hassas bir iyon sensörünü uyandır. Eğer kalıp dizide aynı homopolimer tekrarlar varsa, bir döngüde daha fazla nükleotid zincire katılacaktır. Bu durum, daha çok sayıda hidrojen iyonu salınmasına ve orantılı olarak daha yüksek bir elektronik sinyal elde edilmesine neden olur. Sırasıyla eklenen her bir nükleotidin oluşturduğu sinyallere göre okuma gerçekleştirilmektedir. Cihazın en önemli bileşeni kimyasal değişimleri tespit etmek amacıyla kullanılan yarı iletken çiplerdir. Cihazın İyon Proton II çipine sahip modeli, 660 milyon çipten oluşmakta ve tüm insan genomunun dizilenmesi için kullanılabilir.

İkinci yeni nesil dizileme cihazları: Tek molekül dizileycileri

İlk yeni nesil dizileme sistemleri, maliyeti düşük yüksek hacimli dizileme yapabilme kabiliyetine sahiptiler. Ancak tüm bu platformlarda, PCR ile hedef DNA'nın çoğaltılmasına ihtiyaç duyuluyordu. Yöntem iki dezavantaja sahipti. Bunlardan ilki PCR'in pahalı ve zaman alıcı bir işlem olması; diğeri ise bu aşamada hatalı bazların çoğal-

tilmasıydı. Çoğaltılan ürünlerde meydana gelen hata DNA dizi analizini de etkilemekteydi. Bu iki problemi çözmek için, "ikinci yeni nesil" ya da "üçüncü nesil" (otomatize Sanger temelli cihazlar ilk nesil olarak kabul edildiğinde) olarak adlandırılan dizileme platformları geliştirilmiştir. Bu sistemlerde PCR aşamasına gerek kalmadan tek DNA molekülü ile dizi analizi yapılabilmektedir.

İlk tek molekül dizileme cihazı Helicos Genetic Analysis tarafından geliştirilmiştir. Bu sistemde, poly(dA) (deoksiadenin nükleotidleri ve timin nükleotidleri ile elde edilen polideoksiribonükleotid) kuyruğu eklenen DNA parçaları, katı yüzeye bağlanmış oligo(dT) (oligodeoksitimidin çimeni adı verilir) primerleri ile yakalanır. Daha sonra dört bazın her biri sırasıyla eklenerek oluşan floresans ışımaya ölçülür. Cihaz çok kısa okuma dizileri üretmekte, ancak her çalışmada milyonlarca okuma yapabilmektedir. Cihazın yüksek maliyetli (1.3 milyon dolar) ve çok fazla hata oranı olması ve çok kısa okumalar yapmasından dolayı popülaritesi sınırlıdır.

Diğer tek nükleotid dizileycisi ise yakın zamanda Pacific Biosciences tarafından geliştirilmiştir. Bu dizileme platformunda, "sıfır mod dalga alanı" (zero-mode waveguide ZMW) olarak adlandırılan, optik kuyucuk tabanına tek bir DNA polimeraz bağlanmıştır. Bu kuyucuk içinde, DNA polimeraz ile eklenen tek bir nükleotidi tespit edebilecek yeterli ışımaya elde edilebilmektedir. Cihazın okuma kapasitesi birkaç yüz bazdır. İlk ticari Pacific Biosciences cihazı 80.000 ZMW içermekte ve 10 dakika içerisinde 80 megabaz okuma yapabilmektedir. Bu cihaz, test başı maliyetinin düşük olması ve hızlı dizileme özelliklerinden dolayı klinik laboratuvarlarda ideal araç olma potansiyeline sahiptir.

Yeni nesil DNA dizileme sistemlerinin kullanım alanları oldukça geniştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), antimikrobiyal ilaç direncinin global yayılımı ve patojenlerin evrimi gibi konuların insan sağlığını ilgilendiren en önemli tehditlerden olduğunu vurgulamaktadır. Yeni nesil dizileme sistemlerinin mikrobiyoloji alanında potansiyel kullanımı; patojenlerin tespiti, tanımlanması, antimikrobiyal duyarlılık ve epidemiyoloji olmak üzere dört ana başlık altında değerlendirilebilir. Bunların hepsi de DSÖ'nün koyduğu hedefleri karşılayacak alanlardır. Ancak bu sistemlerin, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yerini alması için henüz erken dönemlerde olduğumuz söylenebilir. Nobel kimya ödülünü iki kez almış tek araştırmacı olan Frederick Sanger'in dizi analizi yöntemini tanıttıktan sonra bu alandaki gelişmeler büyük bir ivmeyle gelişmeye devam edecektir. Amaç, daha hızlı ve ucuz dizileme yöntemlerinin geliştirilmesidir. Mikrobiyolojik tanı laboratuvarında yaygın olarak kullanılabilmesinin önündeki en önemli engel, bu sistemlerin henüz yeteri kadar maliyet-etkin olmamalarıdır.

Kaynaklar

- Cox MJ, Cookson WO, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. Hum Mol Genet 2013; 22(R1):R88-94.
- http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_dizileme
- <http://www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-next-generation-dna-sequencing/ion-torre>
- <http://www.genengnews.com/gen-articles/assay-single-molecule-sequencing-advances/2360/>

- <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2010/05.html>
- Kamb A. Next-generation sequencing and its potential impact. *Chem Res Toxicol* 2011; 24(8):1163-8.
- Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013; 155(1):27-38.
- Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog* 2012; 8(8): e1002824.
- Lipkin WI. Pathogen discovery. *PLoS Pathog* 2008; 4(4): e1000002.
- MacLean D, Jones JD, Studholme DJ. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(4):287-96.
- Men AE, Wilson P, Siemerling K, Forrest S. Sanger DNA Sequencing, pp: 3-11. In: Janits M (ed), *Next-Generation Genome Sequencing*. 2005, Wiley Blackwell, Germany.
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11(1):31-46.
- Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 2012; 8(12):e1002808.
- Paszkiewicz K, Studholme DJ. De novo assembly of short sequence reads. *Brief Bioinform* 2010; 11(5):457-72.
- Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5(7):887-900.
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* 2010; 19(R2):R227-40.
- Shendure J, Lieberman Aiden E. The expanding scope of DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2012; 30(11):1084-94.
- Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni nesil DNA dizileme. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Derg* 2011; 1(1):11-18.

MOLEKÜLER TESTLERDE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ

Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER

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

Nükleik asit testleri (NAT), yüksek duyarlılık ve özgüllükte hızlı tanı sağlayabilmeleri, genotip ve antimikrobiyal direnç gibi bilgileri hızla saptayabilmeleri nedeniyle mikrobiyolojide giderek artan oranda rutin tanı ve izlemde kullanılmaktadır. Bu amaçla ticari olarak üretilmiş ve bazıları FDA onayı ve/veya CE belgesi gibi bir değerlendirme sürecini geçmiş testler kullanılabilir gibi, laboratuvar tarafından ihtiyaca göre testler de geliştirilebilir. Tüm laboratuvar testlerinde olduğu gibi, nükleik asit testlerinde de sonuçların doğru ve güvenilir olduğunun gösterilmesi gereklidir. Rutin kullanıma girmeden önce ve girdikten sonra kaliteyi sınamak ve kanıtlamak amacıyla izlenecek yöntemler farklılık göstermektedir. Klinik geçerliliği gösterilmiş ve laboratuvarlarda kullanılmak üzere seçilmiş (veya geliştirilmiş) test için yöntem geçerliliğinin gösterilmesi gereklidir. Amaç, üreticinin belirlediği performansın laboratuvarında kullanıcı tarafından da sağlandığını kanıtlamaktır. Ancak bu koşullarda, test rutin kullanıma sokulabilir. Bu amaçla kontrol edilmesi gereken özellikler, testin doğruluğu, test-içi ve testler-arası kesinliği ve kantitatif bir test ise bunlara ek olarak doğrusalılığıdır. Laboratuvar-yapımı testlerde, kullanıcıya daha fazla sorumluluk düşer. Bu durumda incelenmesi gereken parametrelere, testin analitik duyarlılığı ve analitik özgüllüğü de eklenir. Belirtilen özellikler, kaliteyi incelemek için minimum gerekliliklerdir. Parametreler gereksinimlere göre artırılabilir. Örneğin viral yük saptama testlerinde, kantitasyonun virüsün genotipine göre farklılık göstermediğinin de kanıtlanması gerekebilir. Ticari testlerde, kullanım amacıyla veya test prosedüründe kullanıcı tarafından yapılacak her değişiklik, yöntem geçerliliğinin yeniden incelenmesini gerektirir. Tüm parametreler yeniden değerlendirilebileceği gibi, yapılan değişikliğe bağlı olarak sadece etkilenmesi olası özellikler incelenebilir.

Yöntem onayında, nükleik asit ekstraksiyonundan, sonucun değerlendirilmesine kadar teste ait tüm basamaklar birlikte değerlendirilmelidir. İncelenecek parametreler özetle şunlardır:

- **Analitik duyarlılık** (Saptama alt sınırı): Testin, %95 olasılıkla saptayabildiği en düşük analit miktarıdır. Analit içeren örneklerin dilüsyon serilerinin çalışılması ve probit analizi ile saptanır.
- **Analitik özgüllük**: Test, mikroorganizmanın mümkün olan tüm tipleri ve farklı izolatları ile çalışılmaktadır. Ayrıca, genetik açıdan benzer etkenlerin ve örnekte bulunabilecek diğer mikroorganizmaların test edilmesi ve yalancı reaksiyona yol açmadıklarının gösterilmesi gerekir.

- **Doğruluk**: Bilinen pozitif ve negatif örneklerin (referans örneklerin) yeni test ile çalışılması şeklinde yapılabilir. Bir diğer yöntem, klinik örneklerin incelenen test ve altın standart yöntem ile çalışılması ve sonuçların karşılaştırılmasıdır.
- **Kesinlik** (Test içi ve testler arası): Aynı örnek ile tekrarlanan testlerde elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı veya uzaklığıdır. Standart sapma ve varyasyon katsayısı olarak değerlendirilir. Amaç, gerçek çalışma koşullarında test sonuçlarında saptanabilecek değişkenliğin belirlenmesidir.
- **Doğrusallık**: Kantitatif testlerde, kantitasyon aralığı içinde kalmak koşulu ile analit miktarındaki değişiklik ile test sonucu arasındaki doğrusal ilişkiyi araştırır. Uygun istatistiksel yöntem (örneğin regresyon analizi) ile değerlendirilir.

DNA sekanslama yöntemine dayalı testlerde, primerler ve PCR için yapılacak optimizasyondan sonra, analitik yöntem geçerliliği belirlenmelidir. **Doğruluk** analizi, sekansı bilinen referans örnekler (mutasyon taşıyan ve taşımayan) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Alternatif olarak, test sonucu, farklı bir primer seti ile elde edilecek sekanslama sonucu veya klonlama ve sonrasında çok sayıda klonun sekanslama sonuçları ile karşılaştırılabilir. Dizi analizinde yalancı negatiflik ve pozitiflik olmaması istenir. Sorun saptanırsa yöntemde gerekli değişiklikler yapılmalıdır. **Kesinlik** analizi için birden çok örneğin aynı çalışmada üç kez ve farklı günlerde en az üç kez çalışılması ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması önerilir. Burada, sekansın kalitesi, her bir nükleotid için elde edilen sinyal gücü, sinyal/fon gürültüsü oranı (%20'yi aşmamalıdır), kalite skoru (QV), belli bir kalite skoru (örn: 20) üzerinde elde edilen bazların oranı (%QV20+, %80'nin üzerinde olmalıdır) gibi göstergelerle izlenir. **Analitik duyarlılık**, testin saptayabildiği mutasyon içeren DNA'nın konsantrasyonu olarak belirlenir. Sanger yöntemi için bu oranın %10-20 civarında olması beklenir. Mutasyon içeren DNA'nın mutasyon içermeyen DNA ile dilüsyonları hazırlanarak belirlenebilir. **Analitik özgüllük**, yalancı pozitifliğin oranı olarak da ifade edilebilir. Primerlerin ve elde edilen sekansın BLAST incelemesi ve PCR sonrası jel elektroforezinde özgül olmayan bantların araştırılması ile özgüllük incelenebilir. Testte interferens yapabilecek faktörler (lipid, hemoglobin, heparin, vb) de özgüllük analizinde incelenmelidir.

Yöntem geçerliliğinde incelenen parametreler konusunda, hemen tüm kurumların yaklaşımı benzer olmakla birlikte, her bir parametrenin nasıl değerlendirileceği konusunda farklılıklar ve belirsizlikler bulunmak-

tadır. Bu alandaki rehberler ve yayınlar giderek artmaktadır. Ancak, testle ilişkili mikroorganizmanın toplumda görülme sıklığı, farklı genotiplere ulaşma imkanı, ilgili mikroorganizma için uluslararası standartların varlığı, yöntemin özellikleri gibi nedenlerle, öneriler her zaman uygulanamayabilir. Laboratuvar sorumlularının, bu alandaki gelişmeleri izlemesi ve güncel bilimsel gereklilikler doğrultusunda karar vermeleri önerilmektedir.

Kaynaklar

- Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 550-76.
- Halling KC, Schrijver I, Persons DL. Test verification and validation for molecular diagnostic assays. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136:11-3.
- Health Protection Agency. Guidance on the development and validation of diagnostic tests that depend on nucleic acid amplification and detection. *UK Standards for Microbiology Investigations*. P 4, Issue 1, 2013. (<http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>)
- Pont-Kingdon G, Gedge F, Woodechak-Donahue W. Design and analytical validation of clinical DNA sequencing assays. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136:41-6.
- Public Health England. Quality assurance in the diagnostic virology and serology laboratory. *UK Standards for Microbiology Investigations*. Q 2, Issue 6.2, 2013. (<http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>)
- Rabenau HF, Kesler HH, Kortenbusch M. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007; 40: 93-8.

MOLEKÜLER TESTLERDE İÇ KALİTE KONTROL

Prof. Dr. Aydan ÖZKÜTÜK

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

Tıbbi laboratuvarlarda standartlar doğrultusunda doğru, yinelenebilir ve zamanında sonuç verilmesi, kalite yönetim sistemleri ile sağlanmaktadır. Laboratuvarın testlere yönelik süreçleri; analiz öncesi (pre-analitik), analitik ve analiz sonrası (post-analitik) olarak ele alındığında, her sürecin performansının sistematik olarak izlenmesi ve kalite güvencesinin oluşturulması gereklidir.

Kalite kontrol çalışmaları, bir test sisteminin güvenilir sonuçlar vermesini sağlamak için performansı denetleyen işlemlerden meydana gelir. Kalite kontrolünün amacı, hastanın sonuçları rapor edilmeden önce test sistemindeki başarısızlığa, çevresel koşullara veya teknisyen performansına bağlı oluşabilecek hataları bulmak, ölçmek ve düzeltmektir. ISO 15189 Tıbbi Laboratuvarlar için kalite ve yeterlilik şartlarını tanımlayan standardın 5.6 numaralı başlığı analitik sürecin kalitesinin temini ile ilgili gereklilikleri tanımlamıştır. Buna göre;

- Laboratuvarında istenen kaliteyi sürdürebilmek için tüm testlere iç kalite kontrol (İKK) uygulanmalı ve İKK işlemlerinin nasıl, ne sıklıkla yapılacağı ve sonuçların nasıl yorumlanacağı belgelerde ayrıntılı olarak tanımlanmalıdır.
- Laboratuvarlar dış kalite değerlendirme (DKD) programlarına katılmalıdır.
- İKK ve DKD programlarında elde edilen sonuçlarda hata varsa düzeltici/önleyici işlemler yapılmalıdır.
- Laboratuvarında testler için ölçüm belirsizlikleri tanımlanmalıdır. Bu gereklilik mikrobiyolojik testlerde kalite kontrollerle ve düzenli aralarla yapılan pipet kalibrasyonları ve bunun gibi faaliyetlerle sağlanır.
- Laboratuvarında yeni bir cihaz, sistem ya da kit kullanılmaya başlamadan önce yöntemin geçerliliği kanıtlanmalı, aynı testin farklı cihaz, yer ya da personel ile çalışılması durumunda da geçerlilik çalışmaları tekrar edilmelidir.

Testlerin kalitesinin sağlanabilmesi için her laboratuvarın bir İKK sistemine sahip olması gereklidir. Bu sistem, test sonuçlarının doğru ve kesin (tekrarlanabilir) olmasına, hızlı bir şekilde elde edilmesine ve klinik yararlanımının yüksek olmasına olanak sağlar. Laboratuvar sorumlusu, İKK için uygulanacak yöntemi, yapılacakları ve değerlendirme kurallarını yazılı olarak belirlemelidir. İKK çalışmaları yönetim tarafından veya bu konuda görevlendirilmiş yetkili bir kişi tarafından izlenmeli ve kayıtları tutulmalıdır. İKK kriterleri tam olarak yerine getirilemediği durumlarda düzeltici faaliyetlerde bulunulmalıdır.

Başarılı bir İKK uygulamasını etkileyecek çok sayıda bileşen bulunmaktadır. Klinik örneğe ait birçok özellik

kontrol sonuçlarını etkiler. Örneğin alındığı yer, örnek hacmi, alınma yöntemi, örneğin taşınması ve saklanma koşulları test sonuçlarını değiştirebilmekte, alınan örneklerin ayrılmadan uzun süre bekletilmesi ve tekrarlayan dondurma-çözme işlemleri örneğin kalitesini bozmaktadır.

Örnek tipi test tasarımında önemli bir yer tutmaktadır. Alınacak örnek, aranan hedef mikroorganizmanın yaşam döngüsüne uygun olmalıdır. Aranan etken hücre dışı bir mikroorganizma ise plazma ya da serum, tam kan örneğine göre daha uygun örneklerdir (HBV-DNA ya da HCV-RNA gibi). Örnek hacmi ve uygunluğu diğer önemli özelliklerdendir. Moleküler testlerde genellikle 200 mikrolitre ya da daha düşük örnek hacimleri kullanılmaktadır. Özellikle organizma yükünün az olduğu durumlarda bu düşük hacimler, saptama zorluğu olduğu kadar pipetleme hataları nedeniyle de sonuçların başarısını düşürebilmektedir. Örnek yeterliliğini değerlendirmek için bazı örnek tipleri için insan beta-globin, beta-aktin genleri gibi "house keeping" genlere ait primerlerin teste eklenmesi ve amplifikasyon işlemi sırasında genlerin varlığının araştırılması, başlangıçtaki örneğin yeterliliği hakkında fikir verebilir.

Örnek hazırlama teknikleri test sonuçlarını büyük ölçüde etkiler. Moleküler testlerde nükleik asit hedefinin bütünlüğünün korunması, inhibitörlerin ortamdaki uzaklaştırılması, canlı organizmalardan hedefin serbestleştirilerek küçük hacimlerde yoğunlaştırılması ve amplifikasyonu ya da diğer moleküler testlerin çalışabilmesi için uygun bir sıvı ortama yerleştirilmesi gerekmektedir. Birçok örnek hazırlama yöntemi teknik beceri gerektiren, emek yoğun ve çapraz kontaminasyona açık yöntemlerdir. Bu nedenle, bu aşamalar için ayrı alanların kullanımı önerilmektedir. Sıklıkla kullanılan ekstraksiyon yöntemleri alkali pH, dondurma ve eritme döngüleri, sonikasyon, ısı, deterjan ya da çeşitli enzimlerle nükleik asitlerin ayrıştırılmasını içerir. Günümüzde bu basamaktaki sorunları çözmeye yönelik örnek hazırlığı ve ekstraksiyon basamağını içeren otomatize yeni sistemler devreye girdiyse de, bu sistemler ne yazık ki inhibitör sorununa çözüm getirememişlerdir.

Örneklerde bulunan inhibitörler ile birlikte interferans yapan maddeler de moleküler yöntemlerin önemli sınırlılıkları arasındadır. Analitik duyarlılığı etkileyen ve yalancı negatif sonuçlara neden olan bu maddeler örneklerin içerisinde olabileceği gibi işlemler esnasında dış kaynaklardan da bulaşabilmektedir. Bilirubin, hematin, hemoglobin, heparin, yağlar ve çeşitli ilaçlar inhibitör etki gösterebilirler. Çeşitli metaller ortamdaki enzimatik

substratları etkileyebilirler. Moleküler testlerde özellikle yalancı negatiflik üzere bu hataların fark edilebilmesi amacıyla çeşitli standartlar, referans materyaller ve iç amplifikasyon kontrol (İAK) örnekleri kullanılmaktadır. İdeal bir İAK'ü, hedef dizi ile aynı primer bağlanma bölgesine sahip, benzer uzunluk ve baz kompozisyonu içeren, prob bağlanma bölgesi ayrı olan, tam kantifiye edilmiş ve test saptama sınırından 4-5 kat yüksek konsantrasyonda olan DNA sekansı ya da RNA hedefi için in vitro transkriptlerdir. İAK'leri ekstraksiyon aşamasından önce örneğe eklenmektedir. Kontrolün hedefle aynı ya da benzer ekstraksiyon ve amplifikasyon verimliliğine sahip olması gereklidir. Plazmidler ve "house keeping" genler kontrol amacıyla kullanılabilirler. Testlerde kullanılan kontrol konsantrasyonu ile hedef konsantrasyonunun uygun ayarlanması önemlidir. Çünkü hedef miktarının çok yoğun olduğu durumlarda da İAK'leri kompetitif olarak inhibe olabilmektedir. Ayrıca bu kontroller ile oluşan son sinyal, her test örneği için tek noktalı bir standart eğriye dönüştürülerek buradan başlangıçtaki nükleik asit miktarı da hesaplanabilmektedir.

Kontrol materyalleri testin doğruluğu ve/veya kesinliğine yönelik bilgi veren ve ölçümü yapılan analiti içeren maddeler olup, kontrol materyali olarak önerilen bağımsız kontrollerdir ("external run control"). Kite ait kontroller ise testin çalışmasını sağlamak için tasarlanmış ve üretilmiştir; bağımsız kontrol olarak kullanımı önerilmez. Kalibratörler de cihazları kalibre etmek için kullanılırlar. Cihazların ayarlanması amacıyla kullanılan kalibratörler kontrol olarak kullanılamazlar. Bağımsız kontroller ticari veya laboratuvar yapımı olabilir. Analit miktarı iyi tanımlanmış, klinik olarak anlamlı sınırlar içinde ve çoklu analit içerebilirler. Kontroller hasta örneğine benzer (aynı matriks), stabil ve homojen yapıda olmalıdırlar. Ticari ise, en az bir yıllık izlemde aynı lot numaralı ürünün kullanılması, saklanırken de küçük alikotlar halinde uygun ısıda saklanması önerilir.

İKK uygulamaları iki şekilde yapılmaktadır. İlk yöntemde, örnek hazırlığından sonucun raporlanmasına kadar tüm sürecin takibi yapılır. İkinci yöntemde ise testin analiz basamağında sadece uygulama olur. İlk yöntem rutin örneklerin ikiye bölünmesi veya eski ve uygun koşullarda saklanmış örneklerin yeniden test edilmesi şeklinde yapılabilir. Hasta örneği ikiye bölünür ve biri hasta örneği olarak çalışılırken ikinci örnek bir İKK numarası ile çalışılır ve test sonuçları karşılaştırılır. Örnek sayısının %0.5-1'in tekrarı önerilir. Sonuçlar aylık olarak tüm laboratuvar çalışanları ile birlikte gözden geçirilir. Farklı çıkan sonuçlar değerlendirilmeli, gerekiyorsa testler tekrarlanmalı, sorun kaynakları tartışılmalı ve çözüm üretilmelidir. Bu yöntemin dezavantajı, testte sistematik bir hata varsa her iki sonuç aynı olsa da sonucun doğru olmayabilmesidir. İkinci yöntemde bağımsız kontrol örnekleri hasta örnekleri ile aynı koşullarda çoğaltılarak süreç izlenmektedir. Bağımsız kontrol olarak DSÖ ve çeşitli ticari üreticilerin (www.nibsc.ac.uk, www.biocontrol.com, www.bio-rad.com, www.qnostics.com) sertifikalı kontrolleri kullanılabilir. Seçilen kontrol örneği 20 ayrı testte çalışılarak ortalama

değer ve standart sapma belirlenir. Veriler "Shewart/Levey-Jennings" grafiklerine işlenir ve çalışmanın geçerliliği "Westgard" kuralları ile belirlenir. Kantitatif testlerde İKK olarak her çalışmada en az iki farklı düzeyde (düşük pozitif, pozitif) kontrol materyalinin kullanılması önerilmektedir ve testlerin İKK sonuçları Westgard kurallarına göre değerlendirilir.

Test sonuçlarında doğal bir varyasyon (kullanıcı, çevresel koşullar ve testin özellikleri sebebiyle) olabilmektedir. "Levey-Jennings" grafiği kullanılarak, hatadan kaynaklanan değişkenliği normal dağılımdan ayırt etmek mümkün olabilir. İdeal olarak kontrolün ölçüm sonuçları ortalamasının içinde/etrafında (± 2 SD) kalmalı, yukarı-aşağı kaymalar minimum olmalıdır. Yukarı ve aşağı aşırı oynamalar genellikle teknik hatayı, tek yöne kayma eğilimi (yukarı veya aşağı) ise genellikle yöntem değişikliğini göstermektedir. Önce hatanın kaynağı araştırılır; bunlar iyi standarde edilmiş teknik, reaktif sorunu, cihaz sorunu ve insan hatası olabilir. Saptanmış olan hata kaynağı ortadan kaldırılır. Test, hasta örnekleri ve kontrol ile birlikte tekrar edilir. Kontrol sonucu düzgün çıkmadan hasta sonuçları verilmez. Ayrıca eğitimin validasyonu ve devamlılığı sağlanır ve gerekiyorsa test rehberleri güncellenir.

Ticari testlerde kontrol materyallerinin hazırlanma ve depolanması, üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmalı, alikotlar halinde saklanmalıdır. Liyofilize kontrollerin dilüsyonu için tek bir pipet kullanılmalıdır. Analitin pipet duvarına yapışması ile yaşanabilecek kayıplar minimumda tutulmalıdır. Dondurucu ve soğutucuların sıcaklıkları sürekli izlenmelidir.

Örneklere ait özellikler ve kontrol materyallerinin yanı sıra laboratuvar suyunun kalitesi, PCR tüplerinde kullanılan plastiğin kalitesi, pipet ve diğer cihaz ve ekipmanların kalibrasyon ve kontrollerinin yapılmış olması, laboratuvarda uygulamaya konmadan tüm testlerin yöntem geçerliliğinin kanıtlanmış olması, personel yetkinliğinin düzenli olarak kontrol edilmesi ve klinik bulgularla korelasyon, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında kalite güvencesi için önemli unsurlardır.

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında doğru ve güvenilir test sonuçları için kalite kontrol uygulamaları çok gereklidir. Ancak laboratuvarların aynı zamanda etkin bir kaynak yönetimine (insan ve malzeme), yerleşim ve ortam koşullarını düzenleyen bir yapıya, bilgi yönetim sistemine, denetim mekanizmalarına, kayıt ve belgelerini izleyecek bir sisteme ve hataları fark ederek düzeltici, önleyici etkinlikler düzenleyebilecek dinamik bir yapıya yani bir kalite yönetim sistemine gereksinimi olduğu, kalite kontrolünün de bu sistemin bir parçası olduğu unutulmamalıdır.

Kaynaklar

- Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A: Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. 2009, SE Sharp Coordinating ed. ASM Press, Washington DC.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA): CLIA-related publications from the Federal Register & Code of Federal Regulations. <http://wwwn.cdc.gov/clia/chronol.aspx>

- Dubois DB, Brown JT. Laboratory controls and standards. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al. (eds), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2004, 1st ed. ASM Press, Washington DC.
- Huisman W. European medical laboratory accreditation. Present situation and steps to harmonisation. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(7): 1147–52.
- ISO 15189: 2007. *Medical laboratories-Particular requirements for quality and competence*. International Organization for Standardization, Geneva.
- Kessler H, Raggam RB. Quality assurance and quality control in the routine molecular diagnostic laboratory for infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(7): 1153-9.
- Madej RM, Davis J, Holden MJ, Kwang S, Labourier E, Schneider GJ. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *J Mol Diagn* 2010; 12(2): 133-43.
- Payne DA, Mamotte CD, Gancberg D, et al; on behalf of the IFCC Committee for Molecular Diagnostics (C-MD). Nucleic acid reference materials (NARMs): definitions and issues. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 1531-5.
- Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, Debonville D, Spadoro JP. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1): 191-7.
- World Health Organization. *Laboratory Assesment Tool*, 2012. WHO/HSE/GCR/LYO/2012.

MOLEKÜLER TESTLERDE DIŞ KALİTE KONTROL

Prof. Dr. Nuran ESEN

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

Kalite, bir ürün veya hizmetin, beklenti ve gereksinimleri karşılama yeteneğidir. Laboratuvarında kalite güvencesi; analiz öncesi, analiz ve analiz sonrası tüm süreçlerdeki performansların sistematik olarak izlenmesidir. Kalite güvencesinin bir parçası olan kalite kontrol ise sadece analitik sürecin doğruluk ve yinelenebilirliğini denetleyerek kaliteyi sağlamayı hedefler. İç kalite kontrolün amacı çalışılan testte oluşabilecek hataları, hasta sonuçları rapor edilmeden saptamak ve düzeltmektir. Dış kalite değerlendirme ise laboratuvarın performansını diğer merkezlerle karşılaştırır, olası sistematik hataların önceden saptanmasını sağlar. Test sonuçlarının güvenilirliği için yılda en az bir kez dış kalite değerlendirme programlarına katılım çok önemli bir göstergedir. Uygun olmayan sonuçlarda eğitim ve iyileştirmeler için fırsatlar sağlar.

Dış kalite değerlendirme programlarının seçiminde dikkat edilmesi gereken birçok özellik bulunmaktadır. Program sağlayıcının ISO 17043 akreditasyon belgesine sahip olması, programın teknik danışmanları, katılımcı sayısı, gönderilen örneklerin laboratuvara gelen klinik örneklerle benzer olması, örnek miktarının çalışılan yöntem için yeterli olması, analit konsantrasyonunun çalışılan yöntemin duyarlılığı ve kantitasyon aralığı ile uyumlu olması, testlerin sonuçlanması için yeterli sürenin verilmiş olması, sonuç raporlarının kullanıcıya kısa sürede ulaştırılması ve programın ücreti dikkatle değerlendirilmelidir.

Dış kalite değerlendirme (DKD), en yaygın olarak yeterlilik testleri ile uygulanmaktadır. Laboratuvarların kayıt yaptırdıkları yeterlilik testi program sağlayıcıları; hazırladıkları örnekleri katılımcılara gönderir. Katılımcı laboratuvarlar ise program sağlayıcılar tarafından gönderilen örnekleri, rutin örnekleri çalışan personel ve rutinde kullanılan yöntemle çalışıp sonuçları belirlenen süre içinde bildirir. Program sağlayıcılar, tüm laboratuvarlardan gelen sonuçların istatistiksel analizlerini yapar, her laboratuvara sonuçlarını diğer laboratuvar sonuçlarıyla karşılaştırarak bildirir. Laboratuvar, istatistiksel analizler sonucunda uygun olmayan sonuçlar için düzeltici faaliyetler düzenlemelidir.

Yurdumuzda DKD programlarına kayıt, genellikle ticari testlerin ihale şartnamesine eklenerek yapılmaktadır. Bu nedenle zaman zaman istenmeyen programlara kayıt edilme ve ihale zamanlarında programın kesintiye uğra-

ması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. DKD programlarının kurum yönetimlerince ayrıca satın alınması bu sıkıntıları azaltacaktır.

Ülkemizde laboratuvarların DKD programlarına katılımı son yıllarda giderek artmaktadır. Sağlık Bakanlığı'nın hazırladığı "Hastane Hizmet Kalite Standartları" (HKS) da bu katılıma katkıda bulunmuştur. Henüz HKS'de dış kalite programlarına sadece katılım zorunlu tutulsa da, uzun yıllardır uygulandığı Amerika Birleşik Devletleri'nde DKD programlarından elde edilen sonuçlar için de kurallar oluşturulmuştur.

Dış kalite değerlendirmeleri, laboratuvar sonuçlarının güvenilirliğini destekler. Kalite kontrol çalışmaları ve düzeltici faaliyet uygulamalarına yönelik tüm adımlar, hazırlanacak belgelerde yazılı hale getirilmelidir. Kalite uygulama verileri laboratuvar sorumlusu tarafından gözden geçirilmelidir. Uygunsuz sonuçların nedenleri süreç göz önüne alınarak irdelenmeli, düzeltici faaliyetler uygulanmalı ve eğitimler düzenlenerek iyileştirmeler için fırsatlar yaratılmalıdır. Kalite kontrol çalışmalarındaki hatalar, çalışanların yanı sıra çeşitli çevresel faktörlere de bağlı olabilir. Laboratuvarında sonuçları etkileyecek tüm değişkenler dikkatle değerlendirilmelidir. Kullanılan ekipmanların bakımı ve izlemi düzenli olarak yapılmalıdır. Ayrıca ısı ve nem gibi çevresel faktörler de uygun hale getirilmelidir.

Laboratuvarlar kalite yönetim sistemini özümsemeli, uygulamaları kaliteyi yükseltmek amacıyla gerçekleştirmelidirler. Kalite kontrol süreçleri için harcanan kaynaklar, ancak yüksek kalite hedefi benimsendiğinde amacına ulaşacaktır.

Kaynaklar

- Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(3):550-76.
- Madej R. Using standards and controls in molecular assays for infectious diseases. *Mol Diagn* 2001; 6(4):335-45.
- Staines HJ, Garcia-Fernandez L, Pogohtata R, et al. Monitoring performance of nucleic acid-based diagnostic measurement system users by EQA. *Accreditation and Quality Assurance* 2009; 14(5): 243-52.
- Wallace PS, MacKay WG. Quality in the molecular microbiology laboratory. *Methods Mol Biol* 2013; 943:49-79.
- World Health Organization. Laboratory quality management system: handbook. 2011. <http://www.who.int/ihr/publications/lqms/en/>

SİTOMEGALOVİRUS (CMV) MOLEKÜLER TANISI VE İZLEMİ

Prof. Dr. Dilek ÇOLAK

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

Sitomegalovirus (Cytomegalovirus; CMV) *Herpesviridae* ailesi, *Betaherpesvirinae* alt ailesi içinde bulunan, bilinen en büyük insan viruslarından birisidir. Primer enfeksiyonun ardından virus vücutta latent olarak kalmaktadır. İmmün sistemi normal konakta genellikle asemptomatik ya da kendiliğinden iyileşen iyi seyirli enfeksiyonlara yol açarken; transplant alıcıları gibi immün sistemi zayıflamış ya da gelişmemiş konaklarda önemli hastalık ve ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır.

CMV, böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda en sık görülen viral patojendir. Enfeksiyon asemptomatik seyredebileceği gibi, ateşli hastalık veya organ tutulumu ile de karşımıza çıkabilir. CMV enfeksiyonu ve hastalıklarının ortaya çıkışında verici (V) ve alıcının (A) transplantasyonu öncesi CMV serolojileri çok önemlidir. Verici CMV seropozitif, alıcı CMV seronegatif (V+/A-) ise risk en yüksek düzeydedir; V+/A+ ve V-/A+ ise orta riskli, V-/A- ise en düşük riskli kabul edilmektedir. Diğer yandan CMV enfeksiyonu ve hastalıklarının ortaya çıkışında transplantasyonu sonrasında uygulanan immün süpresif tedavi de önemli rol oynamaktadır; immün süpresyon derecesi arttıkça CMV enfeksiyonu ortaya çıkışı ve şiddeti de artmaktadır.

CMV enfeksiyonları transplantasyondan sonraki ilk üç ayda sıklıkla görülür. CMV'nin direkt ve indirekt etkileri ile klinik tablo gelişir. Direkt etkilerde organ tutulumu söz konusudur ve yüksek CMV viral yükü ile ilişkilidir. Ateroskleroz, rejeksiyon, fırsatçı enfeksiyonlar, diabetes mellitus ve immün süpresyon ise indirekt etkiler olarak sıralanabilir. Herhangi bir klinik bulgu olmaksızın virusun klinik örneklerde saptanması CMV enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Klinik örneklerde CMV saptanmasına ilaveten; ateş, halsizlik, lökopeni ve sıklıkla trombositopeni varlığı CMV sendromu, özgül organ tutulumu varlığı ise CMV hastalığı olarak ifade edilmektedir. CMV'nin allograft ve hasta sağkalımı üzerine ciddi etkileri vardır; bu nedenle her transplant alıcısında transplantasyonu sonrası dönemde CMV etkilerinin önlenmesi anahtar rol oynamaktadır. CMV etkilerinin önlenmesinde; antiviral profilaksi, pre-emptif tedavi veya ikisinin birlikte olduğu hibrid uygulamalar yapılabilir. Antiviral profilaksiste, risk durumu gözlemlenmeden tüm hastalara antiviral ajanlarla (gansiklovir, valgansiklovir, valasiklovir) 3-6 ay profilaksi yapılmaktadır. Preemptif tedavide ise, CMV hastalığı gelişebilecek hastalar önceden belirlenerek bu hastalara antiviral tedavi uygulanır ve viral yükün negatifleşmesi sağlanmaya çalışılır. Antiviral profilaksi ile CMV'nin indirekt etkileri de önlenmektedir, ancak profilaksi sonrasında özellikle V+/A- alıcılarda geç CMV hastalığı gelişebilmektedir.

Transplantasyonu sonrası dönemde CMV enfeksiyonlarının tanısında kantitatif sonuç veren testler tercih edilmektedir. Ayrıca bu testlerle hastalarda CMV viral yük takibi de yapılmaktadır. Transplantasyonu sonrasında CMV viral yük takibi pre-emptif tedavi uygulaması için bir gereklilik iken, bugün profilaksi uygulayan bazı merkezlerde de tercih edilmektedir. Kantitatif sonuç veren testler; pp65 antijenemi testi ve nükleik asit tayinine yönelik testlerdir. Son yıllarda, gerekli altyapının bulunduğu laboratuvarlarda nükleik asit testleri (NAT), özellikle de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) testleri tercih edilmektedir. Gerçek zamanlı PCR testlerinde en önemli sorun standardizasyonun (farklı ekstraksiyon yöntemleri, farklı hedef dizileri, farklı PCR koşulları, farklı matriks kullanımı gibi) olmamasıdır. Ticari olarak; DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon ve saptama işlemlerini otomatik olarak yapan sistemlerle hem kontaminasyon en aza indirgenmekte ve hem de testin kendi bütünlüğü içinde standardizasyonu sağlanmaktadır. Ancak farklı ticari kitleri ya da kendi tasarladıkları Rt-PCR testlerini kullanan laboratuvarlarda aynı örnekler çalışıldığında sonuçlar arasında önemli (3 log₁₀'a kadar) farklılıklar olduğu saptanmıştır. Bugüne kadar transplantasyonu yapılan merkezlerde CMV Rt-PCR testlerinde tanı ve antiviral tedavi için çeşitli eşik değerleri bildirilmiştir. Ancak yukarıda belirtilen standardizasyon sorunundan dolayı bildirilen eşik değerler arasında bir birliktelik bulunmamaktadır. Bu nedenle bir merkez tarafından bildirilen eşik değer, diğer bir merkez için bir anlam ifade etmeyebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü farklı NAT kullanan laboratuvarlardan rapor edilen sonuçların standardizasyonu için 2012 yılında "Uluslararası CMV Kantitasyon Standardı" geliştirilerek kullanıma sunulmuştur. Bu standartla NAT testlerinin geliştirilmesi ya da kalibre edilmesi ile farklı laboratuvarlardan verilen sonuçlarda bir standardizasyon sağlanacağı düşünülmektedir. Ancak farklı DNA ekstraksiyon sistemleri ve farklı örnek matriksleri sonuçlara etki edebilir. Bu durumda, kabul edilebilir bir standardizasyon sağlanana kadar hastaların mümkünse hep aynı testle ve aynı örnekle takip edilmesi en doğru yaklaşım olacaktır.

Transplant alıcılarında CMV enfeksiyonlarının tanı ve izleminde CMV Rt-PCR testi plazma veya tam kan örneklerinde çalışılabilir. Kanda mononükleer hücrelerde latent CMV olabileceği için plazma örneği tercih edilmektedir. CMV seropozitif alıcılarda düşük viral yük düzeylerinin klinik anlamı olmayabilir. Henüz uluslararası standart kullanılarak kalibre edilmiş testlere göre klinik anlamı olan bir eşik değer belirlenmediğine göre, böbrek transplant alıcılarında hangi viral yük düzeyi önemlidir?

Saptanan tek bir değerin önemi tartışmalıdır; hastaların monitörize edilmesi gereklidir. Viral yükteki artış önemli olup; ne kadar hızlı artıyorsa, hastalık gelişme riskinin o kadar fazla olduğu söylenebilir. CMV viral yükü <1000 kopya/mL olduğunda, düzeyde <5 (0.7 log₁₀) kat artışın klinik anlamı olmadığı; CMV viral yükü >1000 kopya/mL ise x3 kat ve daha fazla artışların klinik önemi olduğu belirtilmektedir. Bunlara ek olarak, CMV viral yükündeki artış ve azalmaların klinik önemini değerlendirmede, virusun in vivo replikasyon dinamiklerini bilmekte fayda vardır. CMV DNA'sının in vivo ortamda iki katına çıkma süresi 1 gündür. Tedavi sırasında CMV DNA'nın yarılanma ömrü ise 3-8 gün olarak bildirilmiştir. Antiviral tedavi başlandığı günkü CMV viral yük düzeyi mutlaka bilinmelidir. Tedavinin ilk haftasında viral yük artabilir, bu dirençle ilişkili değildir, ancak tedavi bitiminde viral yükün negatifleşmesi, en azından çok düşük değerlere inmesi beklenir. Tedavi sırasında viral yükün artmaya

devam etmesi, ya da başta bir miktar azaldıktan sonra tekrar yükselmeye başlaması ilaç direncini akla getirmelidir. Viral yük düzeyleri CMV seronegatif alıcılarda seropozitiflere göre daha yüksektir.

Kaynaklar

- Harvala H, Stewart C, Muller K, et al. High risk cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *J Med Virol* 2013; 85:893-8.
- Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA Testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis* 2012; 54:1793-7.
- Pang XL, Fox JD, Fenton JM, et al. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9:258-68.
- Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infect Chemother* 2013; 45(3):260-71.
- Razonable RR, Humar A; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13 (Suppl 4):93-106.

TRANSPLANT HASTALARINDA GÖRÜLEN BKV ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER TANISI VE İZLEMİ

Doç. Dr. Derya MUTLU

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

BK virus (BKV) ilk kez 1971 yılında, böbrek transplantasyonu yapılan bir hastanın idrarından izole edilmiş ve hastanın ad ve soyadının baş harfleri kullanılarak adlandırılmıştır (1). Yaklaşık 25 yıllık süreçte çok fazla araştırılmayan BKV, Pittsburgh Üniversitesi'nde, 1995 yılında bir hastadan yapılan renal allograft biyopsisinde interstisyel nefropati tanımlanması ve hastanın örneklerinin histolojik ve moleküler incelemeleri sonucunda BKV'nin saptanmasıyla, yeniden önem kazanmıştır (2). Bu ilk olgunun ardından dünyadaki pek çok böbrek transplantasyonu merkezi tarafından BKV ile ilişkili interstisyel nefropati rapor edilmiştir (3). İsviçre'de yapılan araştırmada, 1985-1995 yılları arasında gelen renal allograft biyopsi örneklerinin retrospektif taramasında BKV'nin saptanmaması, BKV enfeksiyonlarının, gerçekten de 1995 yılı ile birlikte görülmeye başladığını kesinleştirmiştir. Daha sonraki dönemde BKV nefropatisinde artış gözlenmiş ve bu durumun takrolimus, mikofenolat mofetil ve sirolimus gibi immün süpresif ilaçların kullanımının artması ile paralellik göstermesi, ortaya çıkmasında en önemli etkenin güçlü immün süpresifler olduğunu düşündürmüştür (4).

BKV'nin Genel Özellikleri ve Epidemiyolojisi

Polyomaviridae ailesi *Polyomavirus* cinsi içinde sınıflandırılan BKV, ikozahedral kapsidli, zarfsız, 40 nm çapında küçük bir virustur. Kapsidinde, virusun replikasyonu sırasında geç dönemde ortaya çıkan ve VP1, VP2 ve VP3 olarak adlandırılan üç farklı protein bulunmaktadır. Yaklaşık 5kb büyüklüğündeki genomu, çift iplikli çembersele DNA'dan oluşur ve erken, geç ve kodlama yapmayan kontrol bölgesi (non-coding control region; NCCR) olmak üzere üç gen bölgesi içerir (5).

BKV'nin kesin geçiş yolu henüz tam olarak bilinmemektedir; ancak 5-9 yaş çocukluk döneminde %65-90'a varan seropozitiflik oranı ve tonsiller dokuda viral DNA varlığı, insandan insana solunum veya oral yolla bulaşı düşündürmektedir (5). Dış ortamda canlılığını uzun süre sürdürebilmesi ve insan atıklarıyla kirlenmiş sularda saptanması, fekal-oral ve ürino-oral bulaşın da kuvvetle olası olduğunu düşündürmektedir (6). Kordon kanı örneklerinde BKV IgM'nin, fetal ve plasental dokularda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile BKV DNA'nın saptanması transplasental geçişin de olabileceğini düşündürse de henüz bulgular çelişkilidir (5).

Genellikle erken çocukluk döneminde rastlanan primer enfeksiyonlar çoğu zaman asemptomatik olup, bazen de hafif solunum yolu hastalığı şeklinde seyredebilir (7). Primer enfeksiyonlar sonrasında başta ürotelyal hücreler

olmak üzere birçok hücrede latent şekilde varlığını sürdürmektedir (4). BKV reaktivasyonu ile sıklıkla karşılaşmakta; reaktivasyon sıklığı gebelikte, yaşlılıkta ve diabetik hastalarda %25'lere dek ulaşabilmektedir (4).

BKV, immün süpresif bireylerde reaktive olduğunda ölümlü ya da transplante edilen organın yitirilmesi ile sonuçlanabilen ciddi klinik tablolar oluşturabilmektedir. Bunlar arasında, renal transplant hastalarında görülen BKV ile ilişkili nefropati (BKVN) ve kemik iliği transplant (KİT) hastalarında görülen geç başlangıçlı hemorajik sistit (HS) en sık karşılaşılanlardır.

BKV-İlişkili Nefropati (BKVN)

Renal transplantasyondan sonra BKV reaktivasyonu oluştuğunda ilk olarak virüri gözlenir. Yüksek düzey virüri (BKV yükü > 7 log₁₀ genom ekivalan (geq)/ml) renal transplant hastalarının yaklaşık üçte birinde viremiye ve BKVN'ye dönüşür. Viremi, virürinin ardından yaklaşık bir ay sonra gelişir ve viremi öncesinde her zaman virüri vardır. Virüri ve viremi birlikteliği genellikle erişkinde de, çocukta da BKVN'ye öncülük etmektedir (8). Erişkin renal transplant alıcıları için önemli bir sorun olan BKV enfeksiyonları, pediatrik grupta, primer enfeksiyon olasılığının daha fazla olması sebebiyle, BKVN'ye daha sık sebep olmaktadır (9). Merkezimizde 142 pediatrik renal transplant hastasında yapılan bir çalışmada, %80.3 ve %59.6 sıklıklarında sırasıyla virüri ve viremiye rastlanırken, %19.7 sıklığında BKVN ile karşılaşmış ve hastaların %1.4'ü BKVN nedeniyle böbreklerini kaybetmişlerdir (10).

Transplantasyon sonrasında uygulanan immün süpresyon BKVN oluşumunda temel risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Ancak bunun yanı sıra, hastaya ait risk faktörleri; ileri yaş, beyaz ırk, erkek cinsiyet, transplantasyon öncesinde BKV seronegatifliği veya BKV'ye özgül antikor düzeyinde düşüklük, diyabet ve daha önceden BKVN'ye bağlı greft kaybı olarak sayılabilir (5). Risk oluşturduğu düşünülen greft özellikleri ise donörün seropozitif olması veya antikor titresinin yüksek olması, HLA uyumsuzluk düzeyi, HLA-C7 eksikliği, soğuk iskemik süresinin uzunluğu, intrarenal inflamasyon ve greftin kadavradan olmasıdır (5).

Hemorajik Sistit (HS)

BKV'ye bağlı HS, KİT hastalarında %5-60 arasında değişen oranlarda rastlanan bir durumdur. Transplantasyondan sonraki 2 haftada gelişir ve geç başlangıçlı HS olarak isimlendirilir. Hastalığın en ağır seyirli kliniklerinde obstrüktif nefropatiye bağlı renal yetmezlik görülmektedir (11). Merkezimizde 130 pediatrik kök hücre alıcısında

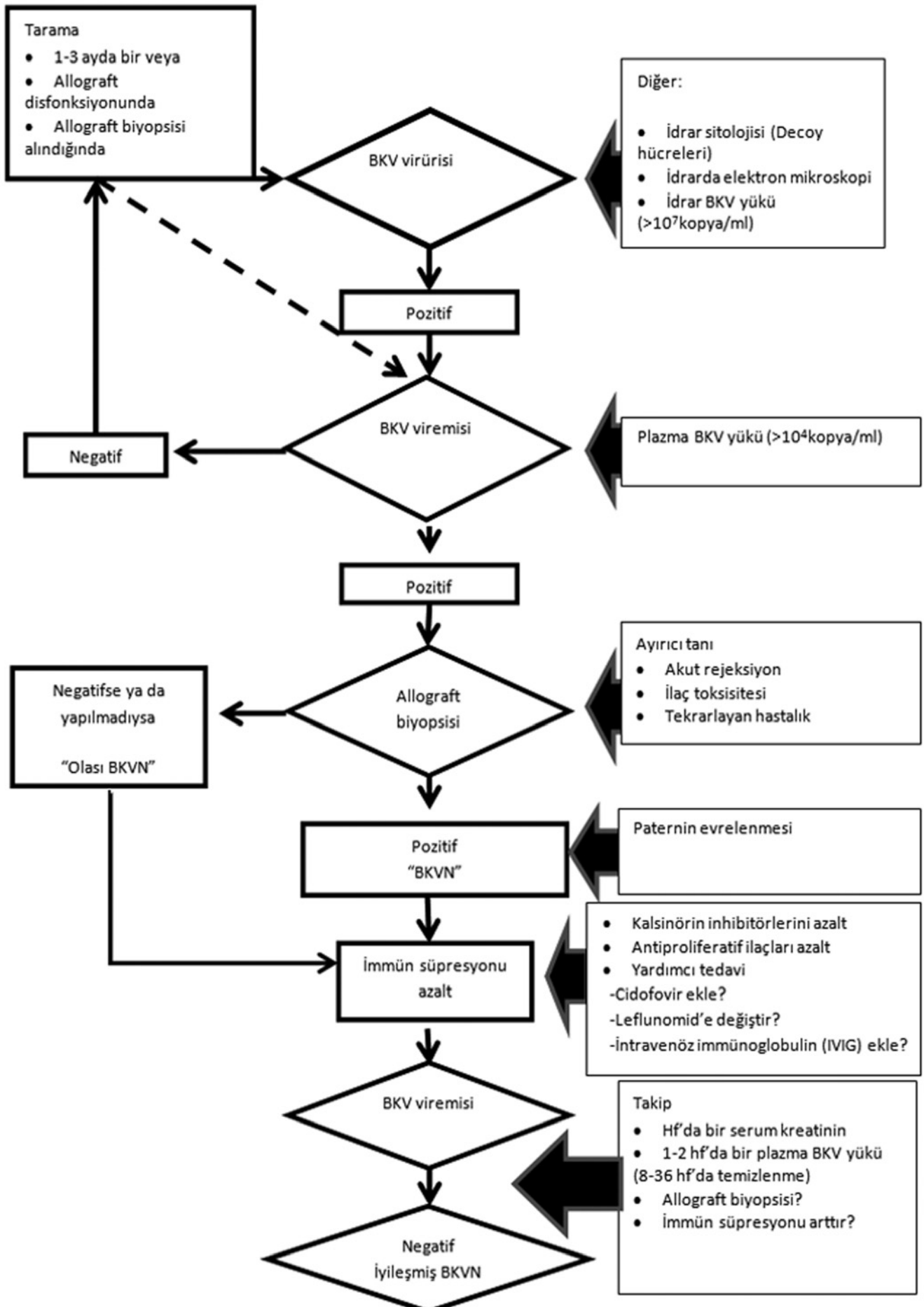
yapılan bir çalışmada, hematüri görülen hastalarda, görülmeyenlere kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde BKV viremisine daha sık rastlanmıştır (12).

BKV Enfeksiyonlarının Tanısında Kullanılan Yöntemler

Renal transplantasyon yapılan hastalarda BKVN'yi engellemenin tek yolu, transplantasyon sonrasında BKV enfeksiyonlarının çok yakın takibi ve BKVN geliştiren hastaların erken dönemde tanınıp etkin biçimde tedavi edilmeleridir. Virusun hücre kültüründe çok yavaş üreyip olması, hücre kültürü yönteminin pratikte uygulanmasına izin vermemektedir. Ayrıca, çok yaygın görülmesinden dolayı serolojik testler, aktif enfeksiyon varlığını göstermede işe yaramamaktadırlar. İdrar örneklerinde, viral inklüzyonlar içeren renal tübüler epitel hücrelerinin (Decoy hücreleri) varlığı, BKVN için çok yüksek pozitif prediktif değere sahip olsa da, negatif prediktif değerinin çok düşük oluşu ve tecrübeli personele ihtiyaç duyulması nedeniyle pratikte kendine yer bulamamaktadır. Plazma ve idrar örneklerinde virusun DNA'sının moleküler yöntemlerle gösterilmesi, böbrek ve kök hücre nakli yapılan hastalarda, nakil sonrası aktif enfeksiyonların saptanması ve tedavi izleminde önerilen yöntemdir. Bununla birlikte renal transplant hastalarında, renal biyopsi örneklerinin sitogenetik yöntemlerle BKVN açısından değerlendirilmesi, tanı algoritmalarında kullanılan bir testtir. Hirsch ve arkadaşları, renal transplant hastalarının BKV enfeksiyonları açısından takibine yönelik bir algoritma oluşturmuşlardır (Şekil) (13). Bu algoritmada takip sırasında virüri araştırılmakta, virüri varlığında viremi araştırılmakta, tanının doğrulanması için biyopsi örneklerine başvurulsa da BKVN açısından negatif bulunan biyopsilerde bile olası BKVN dışlanamadığından tedavi seçenekleri uygulanabilmektedir. Dolayısıyla böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda ciddi enfeksiyonlar oluşturan BKV, transplant merkezlerinde önlem alınması gereken önemli bir enfeksiyöz ajandır.

Kaynaklar

1. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253-7.
2. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 671-3.
3. Nicleleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1080-9.
4. Randhawa P, Vats A, Shapiro R, et al. BK virus: discovery, epidemiology and biology. *Graft* 2002; 5: 19.
5. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611-23.
6. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 354-60.
7. Kuppachi S, Thomas B, Kokko KE. BK virus in the kidney transplant patient. *Am J Med Sci* 2013; 345: 482-8.
8. van Aalderen MC, Heutinck KM, Huisman C, Ten Berge IJ. BK virus infection in transplant recipients: clinical manifestations, treatment options and the immune response. *Neth J Med* 2012; 70: 172-83.
9. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, et al. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 2109-17.
10. Mutlu D, Saglik I, Koyun M, et al. BK virus infections in pediatric kidney transplant recipients. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47: 461-71.
11. Wong AS, Chan KH, Cheng VC, Yuen KY, Kwong YL, Leung AY. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 830-7.
12. Mutlu D, Eker N, Sağlık İ ve ark. Pediatrik kök hücre alıcılarında, plazma ve idrar örneklerinde BK virus düzeylerinin kantitasyonu ve hemorajik sistitle ilişkilendirilmesi. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 10-13 Kasım 2013, Antalya.
13. Hirsch HH, Randhawa P; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 179-88.



Şekil. BKVN saptanmasına yönelik tarama programı (13 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

İMMÜNOLOJİK İZLEM

Prof. Dr. Meral GÜLTEKİN

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Antalya

Transplant hastalarında enfeksiyon hastalığı riski, tanısı ve tedavinin izleminde hekim, aşağıda belirtilen üç temel dayanak noktasından hareket ederek “organın reddedilmediği, enfeksiyon hastalığının oluşmadığı denge durumunu” sürdürmek ister:

1. Etkenin özellikleri: Tanısı, miktarı, virülansı, vb.
2. İmmün süpresif tedavi: Protokolü, düzeyi, vb.
3. Konumuzun içeriği olan konağın immün yanıtı: CMV ve BKV enfeksiyonlarında konak hümmoral yanıtı, esas olarak virusla temas edip etmediğimizi belirlediğinden transplantasyon öncesi alıcı ve vericinin serolojik özelliklerinin saptanmasında yararlı ve gereklidir. İmmünolojik izlem başlığı altında ele aldığımız ise, konağın virüslara -CMV ve BKV -gösterdiği hümmesal bağışık yanıtın izlemidir.

ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot Assay)

Yöntemin esası IFN- γ sentezleyen özgül T hümmelerinin araştırılmasıdır. İlk kez Czerkinsky tarafından (1983) antijene özgül antikor salgılayan B hümmelerin ölçümünde ve hemen ardından (1988) sitokin salgılayan T hümmelerinin ölçümünde kullanılmıştır (1). Öncelikle heparinli tüplere alınan kan örneğinden dansite gradient santrifüstasyon yöntemi ile mononükleer hümmre izolasyonu yapılır. Otomatik olarak veya hemositometre ile sayılan hümmreler belli yoğunlukta ayarlanarak ELISPOT deneyine alınır. Sitokine özgül monoklonal antikorlar katı bir faz üzerinde immobilize edilmiştir. IFN- γ ile kaplı bu plaklara hümmreler inoküle edilerek, antijen veya mitojen varlığında oluşacak sitokin salınımı IFN- γ monoklonal antikor tarafından yakalanır ve klasik EIA basamakları uygulanmaya başlanır. Yıkamalarla hümmrelerin uzaklaştırılmasından sonra biotinlenmiş veya enzimle konjuge antisitokin antikorlar eklenir, ardından substrat eklenmesiyle oluşan renkli özgül spot oluşturan IFN- γ sentezleyen T hümmreleri bir diseksiyon mikroskobu altında veya ELISPOT okuyucu ile sayılır. Sonuç “Spot Forming Colonies (SFC) ya da Spot Forming Unit (SFU)/ 100.000 ya da 200.000 mononükleer hümmre” olarak verilir.

Abate ve arkadaşları (2), kalp transplantasyonu yapılan hastalarda nakil sonrası 100. günde 50/200.000 SFU değerini CMV reaktivasyonunu öngörme açısından anlamlı bir eşik değer olarak belirlemişlerdir. Transplantasyonun birinci yılında CMV'ye özgül T hümmre yanıtını ortalama “171 SFC/200.000 lenfosit” olarak bulurken, bu sayının transplant öncesi “326 SFC/200.000 lenfosit” olduğunu, dolayısıyla antiviral T hümmre yanıtının transplantasyon öncesi düzeye gelebilmesi için bir yıldan fazla zamana gereksinim olduğunu vurgulamışlardır.

Merkezimizde yapılan BKV immün yanıt araştırmasında, böbrek nakli sonrası hastaların 6 aylık izlem süresince immün yanıtlarındaki değişikliklerin bireysel farklılıklar gösterdiği, kesitsel olarak değerlendirmenin yapılamayacağı ve izlemin gerektiği belirtilmiştir (3). Örnek olarak, nakil sonrası 7. ayda BKV reaktivasyonu saptanan olgunun, reaktivasyon sonrası 2. hafta, 1. ay, 2. ay ve 4. aylarda BKV'ye özgül T hümmre yanıtı değerlendirildiğinde, 2. hafta, 1. ay ve 2. ay plazma BKV yüklerinde düşüş görülürken, BKV'ye özgül immün yanıtta artışın eşlik etmediği, tersine düşüş olduğu gözlenmiş, 2. aydan sonra hastanın plazma BKV yükü tekrar yükselmiş, ancak beraberinde immün yanıtın da artmaya başladığı görülmüştür. 4. ayda immün yanıtta artış devam etmiş ve nihayetinde plazma BKV yükü azalmıştır (3).

Quantiferon

Bu yöntemde tam kan, virüsü uyaran peptid epitoplari ile muamele edilerek T lenfositleri uyarılır ve sentezlenen interferon-gama (IFN- γ) ELISA yöntemiyle ölçülerek kantitatif sonuç verilir. Hümmesal immün yanıt izlemlerinde esas amaç bir eşik değerin belirlenmesidir. Bu şekilde hastanın immün yanıtının, viral reaktivasyonu önleyebilecek düzeyde olup olmadığı ve bu düzeyin ne olduğu araştırılır. Cantisan ve arkadaşları (4), 55 akciğer ve böbrek transplant hastasını değerlendirmişler ve IFN- γ düzeyi nakil öncesi 0.2 IU/mL'den az ise nakil sonrası dönemde CMV reaktivasyon riskinin diğer gruba göre 10 kez fazla olduğunu saptamışlardır. Kumar ve arkadaşları (5), solid organ transplant hastalarını nakil sonrası 0, 1, 2, 3. aylarda CMV hümmesal immünite açısından Quantiferon-CMV testi ile izlemişler ve saptanabilir IFN- γ (cut-off: 0.1 IU/mL) yanıtı olan hastaların %5.3'ünde CMV hastalığı geliştiğini, bu oranın IFN- γ saptanamayan grupta anlamlı düzeyde yüksek (%22.9) olduğunu vurgulamışlardır.

Akım (Flow) Sitometri

Hümmesal yanıtın araştırılmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri, peptid-MHC sınıf 1 tetramerleri ile CMV'ye özgül CD8+ T lenfositlerinin saptandığı tetramer bazlı akım sitometri yöntemidir. Bu tekniğin temeli, antijene özgül T lenfositlerinin, MHC-peptid kompleksi-tetramerik molekül ile doğrudan boyanmasıdır. Gratama ve arkadaşları (6), 2001 yılında kök hümmre alıcılarında tetramer CD8+ T hümmre sayısının 10 hümmre/ μ l üzerinde olması durumunda CMV hastalığına karşı koruyucu hümmesal immüniteden söz edilebileceğini bildirmişlerdir. Aynı merkezden 2010 yılında yayınlanan çalışmada, 83 kök hümmre alıcısında transplantasyon sonrası CMV'ye özgül

CD8+ T lenfosit yanıtı bir yıl izlenmiş ve post-transplant 65 gün içerisinde CMV'ye özgül CD8+ T lenfosit sayısının 7 hücre/µl'den az olması durumunda, bu değer CMV ile ilişkili komplikasyon gelişimini belirlediği ifade edilmiştir (7). Hücrel immünitenin daha geç geliştiği grupta, hücrel immünitesi gelişmiş hastalara göre CMV enfeksiyonu gelişme riski 2.6 kez, CMV hastalığı gelişme riski 6.4 kez, fatal komplikasyon gelişme riski ise 2.4 kez daha fazla bulunmuştur. Tetramer bazlı akım sitometrisi HLA'ya özgül olup, kullanılan MHC peptid-tetramer paneli yanıtı belirlemede yeterli olmayabilir. Sitokin akım sitometri (CFC) metodolojisinde ise, mononükleer hücreler sentetik CMV peptid epitoplara ya da viral lizat ile uyarıldıktan sonra, sitokin sentezleyen CMV'ye özgül T lenfositleri hücre içi sitokin boyaması ile gösterilir ve sayısal değer olarak ifade edilir T lenfositleri, fonksiyonlarının son aşamasında -sitokin sentez aşaması- gösterildiğinden daha duyarlı ve özgüldür. Bizim merkezimizde de, böbrek nakli yapılan 20 hastanın, nakil öncesi ve sonrası 1, 3 ve 6. aylarda IFN- γ sentezleyen CMV'ye özgül T lenfosit sayıları CFC ile değerlendirilmiş; kontrol ve hasta grubunda (CMV seropozitif) nakil öncesi CMV'ye özgül T lenfosit sayıları bakımından fark saptanmamıştır. Ancak hastaların izleminde, IFN- γ sentezleyen CMV'ye özgül CD4+ ve CD8+ T lenfosit sayılarının 3. ayda 1. aydakinden daha düşük olduğu belirlenmiştir (8).

Hücre İçi ATP Ölçümü

Bu yöntem, T hücre bazlı bir yöntem değildir ancak dolaylı olarak konağın hücrel immün yanıtına ilişkin bilgi vermektedir. ImmuKnow yöntemi (Cylex), 2002 yılında, FDA tarafından immün süpresif bireylerde hücrel immün yanıt ölçümünde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Bu yöntem, özgül olmayan yolla lenfosit stimülasyonunun ardından manyetik seperasyon yoluyla ayrılan CD4+ T hücrelerin parçalanması sonucu açığa çıkan hücre içi ATP'nin lüminometrik olarak ölçümüne dayanır. Değerlendirme viral etkene özgül değildir. Transplant hastalarında enfeksiyon ya da akut rejeksiyon için tanısal değildir. Sadece enfeksiyon/rejeksiyon riskini belirlemede kullanılması önerilmektedir (9).

Bugün için ülkemizde, transplantasyon merkezlerinde CMV tanısına yönelik testler ve profilaksi başarı ile uygulanmakta olup, bu alanda önemli yol alınmasına karşın, konağın yanıtı henüz rutin olarak izlenmemektedir. CMV

immünite testlerinin uygulanması aşağıdaki sorulara yanıt bulmamızda yardımcı olacaktır (8):

- Transplantasyon sonrası anti-viral profilaksi alan hastalarda geç dönem CMV enfeksiyonu riski nedir?
- Düşük düzeyde viremi olan hastalarda vireminin kendiliğinden düzelmesi ya da hastalık gelişme riski nedir? Düşük düzey vireminin izlem protokolü nasıl olmalıdır?
- CMV hastalığının tedavisi tamamlandıktan sonra tekrarlayan viremi riski nedir?

Transplant olgularında BKV tanısı ve izlemi, CMV ile karşılaştırıldığında yöntemler daha da kısıtlı kalmaktadır. Hastada enfeksiyonun kliniği ve prognozu ile ilgili olarak sadece BKV DNA yükünün araştırılması yeterli değildir. Enfeksiyondan nefropatiye giden süreci önleyebilmede ve tedavinin izleminde konağın özgül hücrel yanıtının değerlendirilmesi kritik bir önem taşımaktadır(3).

Kaynaklar

1. Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. J Immun Methods 1988; 110(1): 29-36.
2. Abate D, Fiscon M, Saldan A, et al. Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. J Clin Microbiol 2012; 50:1974-80.
3. Mutlu E. Renal transplant hastalarında BKV spesifik immün yanıtın ELISPOT yöntemi ile ölçülmesi. Yandal Uzmanlık Tezi, 2014. Akdeniz Üniv.Tıp Fak.Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Temel İmmünoloji BD, Antalya.
4. Cantisán S, Lara R, Montejo M, et al. Pretransplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. Am J Transplant 2013; 13(3):738-45.
5. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. Am J Transplant 2009; 9:1214-22.
6. Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. Blood 2001; 98:1358-64.
7. Gratama JW, Boeckh MB, Nakamura R. Immune monitoring with iTag MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent CMV infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Blood 2010; 116(10): 1655-62.
8. Doğan Kılınçkaya H. CMV spesifik T hücre yanıtının flow sitometri yöntemi ile optimizasyonu. Uzmanlık Tezi, 2013. Akdeniz Üniv.Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, ,Antalya.
9. Rodrigo E, López-Hoyos M, Corral M, et al. ImmuKnow as a diagnostic tool for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. Liver Transpl 2012; 18(10):1245-53.

ANTİBİYOTİK DİRENCİ SAPTAMADA KÜLTÜRE DAYALI YÖNTEMLER VE DİRENÇTE ANTİBAKTERİYEL TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Prof. Dr. Sesin KOCAGÖZ

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Maslak Acıbadem Hastanesi, İstanbul

Geçmişte enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antimikrobialer hekimin klinik deneyimine göre kullanılmakta iken, antimikrobialerin sayılarının artmasına rağmen, günümüzde gelişen dirençli etkenlerin çokluğu nedeniyle tedavi seçenekleri kısıtlı olmaya başlamıştır. Bu durumda en güvenilir yol, uygun örnekten çalışılmış kültürlerin tanı ve duyarlılık sonuçlarının vakit kaybetmeden elde edilme ihtiyacıdır. Özellikle ağır veya çok ilaca dirençli enfeksiyonlarda, immün yetmezliği ya da genel durum bozukluğu olan hastalarda, gerek mortalite gerekse hastanede yatış süresi ve maliyetlerde artış olduğu bilinmektedir. Mortalite ve/veya sekel gelişme oranını artıran ana faktörlerden biri, kültür ve duyarlılık sonuçları çıkıncaya kadar ortalama 48-72 saatlik bir sürenin geçmesi ve bu nedenle etkin tedavinin erkenden başlanamamasından kaynaklanmaktadır. Bu durum ayrıca, hasta için uygun izolasyon önlemlerinin zamanında alınamamasına, dolayısıyla kurum ve toplum içinde yayılım riskinin artmasına yol açmaktadır. Bu grup etken ile kolonize hastaların da, erken tanımlarının yapılarak yayılımın erkenden önlenmesi için hemen izole edilmeleri çok önemlidir. Cilt ve kolon bölgeleri, çok ilaca dirençli mikroorganizmalar için uygun alanları oluşturmaktadır. Çok sayıda örneğin çalışıldığı laboratuvarların otomatize sistemleri kullanması nedeniyle de, tedavisi sorun olabilecek ESBL veya KPC gibi dirençlerin atlanabilme riski endişesi mevcuttur. Bu nedenle bu gibi tedavide sorun teşkil edecek etkenlerin kontrolü güç olmaktadır.

Etkin bir enfeksiyon kontrol programının yürütülebilmesi için, öncelikle düzgün ve güncel bir veri toplama sistemi bulunmalı, enfeksiyonlardan şüphelenildiği dönemlerde uygun süre ve koşullarda alınmış kültürlerin sonuçları kolayca tanımlanabilmelidir. Kültür ile sonuç alınmasının gecikebileceği yaşamsal durumlarda, bekleme sürelerini kısaltmak ihtiyacı ön plandadır. Ek olarak enfeksiyon kontrol programlarında yaygın olarak kullanılabilmesi için, tanı yöntemlerinin ucuz, kolay, hızlı ve güvenilir olmaları gerekmektedir. Özellikle bütçesi kısıtlı merkezlerde bu tür taramaların maliyet/yarar oranları iyi değerlendirilmelidir. Bu testlerin işletilebilmesi için, hastane laboratuvarlarına kurulum maliyeti ve kullanacak personelin eğitimi dikkate alınmalıdır.

Çok ilaca dirençli mikroorganizmaların aktif sürveyansı, etkenlerin hasta örneklerinden hızlıca tanımlanıp dirençlerinin saptanmasında, hızlı tanı yöntemlerinin kullanılması çok önemlidir. Bu tanımlamalar ile, kolonize hastalar hızlıca izole edilebilir ve uygun dekolonizasyon ile ortam temizliklerinin uygulanması sonucu enfekte veya kolonize olmayan hastalara çapraz bulaşın engellenebilmesi sağlanabilir.

Kültür yöntemi, mikroorganizmaların tanımlanmasında ve antibakteriyel duyarlılık sonuçlarının elde edilmesinde halen altın standarttır. Bu amaçla kullanılan geleneksel kültür yöntemlerinin yavaş kalması söz konusudur. Klasik kültür yöntemlerinin ortalama tamamlanma süresi 3-4 gündür. Ancak rutin bir bakteriyel etkenin tanımlama ve antibiyotik duyarlılığının sonuçlanması en önemli olumsuzluk, günler ile ifade edilen sürelerdir. Özellikle örnek yükü fazla olan mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmak üzere geliştirilen otomatize ve/veya “uzman” (*expert*) sistemler ile, tanımlama ve direnç paternlerinin saptanmasında hızlı ve etkin bir performans hedeflenmektedir.

Tanımlama sürenin kısaltılması amacıyla geliştirilen kültür yöntemleri arasında, kromojenik bazlı besiyerlerinin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Özellikle flora bakterileri arasında aranan etkenin hızlıca saptanabilmesi için özgün renkli koloniler oluşturmaları hedeflenen tiplerinin yanı sıra, henüz koloni oluşturmadan ortamda meydana gelen kimyasal reaksiyonun saptanması için besiyerine konulan bir indikatör yardımı ile renk değişiminin saatler içinde izlenebileceği besiyerleri geliştirilmiştir. Kültür bazlı bu yöntemler, rutin kültür yöntemini kullanan laboratuvar personelinin, ek bilgi-beceri ihtiyacı olmadan rahatlıkla uygulayabilmesine olanak sağlamaktadır.

Kültür bazlı teknikler ile birlikte eş ve tamamlayıcı olarak kullanılmaya başlanan MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight*) kütle spektroskopisi ve biyosensör sistemlerin, iş birliği ile tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sonuçlanma süreleri 1-2 saat gibi kısa sürelere inebilir olmuştur. Bu amaçla ek olarak, akım sitometrisi (Flow cytometric) yöntemleri umut vermektedir. Özellikle direkt boğaz kültürü gibi sürüntü örnekleri veya pozitif sinyal veren kan kültürü şişesi, 2-3 saatlik kısa bir inkübasyondan sonra uygun konsantrasyonlarda antibiyotikler ile karıştırılıp birkaç saat inkübe edilmesi ile, duyarlılık sonuçları saatler ile ifade edilebilecek sürede alınabilmektedir.

Dirençli patojenlerin ortaya çıkışı, elimizde güvenli kullanımı olan kısıtlı sayıdaki antibiyotiğin, ilerleyen zaman içerisinde, enfeksiyonların kontrolündeki etkinliklerinde büyük sorunlara yol açacak gibi görünmektedir. Bu bilgiler ışığında, az sayıda da olsa yöneticiler ile halk sağlığı görevlileri uzman hekimler ile işbirliği yaparak antibiyotik direncini en aza indirecek kullanım yollarını tanımlamak ve etkin kullanım kılavuzları geliştirmek için uğraş vermektedirler. Özellikle reçetelere gereksiz antibiyotik yazılmasının en aza indirgenebilmesi ile, antibiyotiklerin seçici baskısının azaltılması hedeflenmektedir. Her ko-

şulda, özellikle hastaneden izole edilen çok ilaca dirençli bakterilere karşı yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Halihazırda özellikle *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleri, birçok etkin antibiyotiğe direnç geliştirmiş durumdadır. Enterik bakterilerde ise karbapenemler hariç tüm gruplara karşı dirençli suşların yanında karbapenemaz üreten türler gözlenmektedir. Bunun yanı sıra tüberküloz, gonore ve idrar yolu enfeksiyonları gibi toplumda sık görülen enfeksiyonların etkin tedavileri için de yeni ajanların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Yakın zamana kadar etkin antibiyotikler geliştirilemez ise, tedavi edilemez (antibiyotik öncesi dönem) enfeksiyonlar büyük sorunlar olarak karşımıza çıkacaktır.

Kaynaklar

- Al-Wasify RS, Al-Sayed A, Kamel MM. Sensitivity and specificity of chromogenic media for detection of some pathogens in water. Int J Environ Sustain 2013; 2(1): 1-9.
- Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013; 12:22.

- Hrabák J, Chudáková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. Clin Microbiol Rev 2013; 26(1):103-14.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. Lancet Infect Dis 2013; 13(12):1057-98.
- Livermore DM. The need for new antibiotics. Clin Microbiol Infect 2004; 10 Suppl 4:1-9.
- Mitsuma SF, Mansour MK, Dekker JP, et al. Promising new assays and technologies for the diagnosis and management of infectious diseases. Clin Infect Dis 2013; 56(7):996-1002.
- Nuding S, Zabel LT. Detection, identification and susceptibility testing of bacteria by flow cytometry. J Bacteriol Parasitol 2013; S5-005. doi:10.4172/2155-9597.S5-005
- Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. J Appl Microbiol 2007; 103(6):2046-55.
- Razumenko M. Proline-rich antimicrobial peptides and their mode of action. ESCMID News 3-2006, p:28-9.
- Usluer G. Yeni kullanıma giren antibiyotikler. Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics 2003; 1:218-25.
- Watson R. Europe launches 12 point plan to tackle antimicrobial resistance. BMJ 2011; 343:d7528.

ANTİBİYOTİK DİRENCİ SAPTAMADA MOLEKÜLER TANI TESTLERİ

Prof. Dr. Özgen ESER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Dünyada her yıl 17 milyondan fazla insan, birçoğu bakteriyel kaynaklı olan enfeksiyon hastalıklarından ölmektedir. Bakteriyel enfeksiyonların kontrolü klinik mikrobiyoloji laboratuvarında etyolojik ajanın saptanma yeteneğine bağlıdır. Bakteriyel enfeksiyonlarda uygun tedavi kararının verilmesi, bakteriyel patojenin saptanması, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasına bağlıdır. Ancak, tüm bu yöntemler zaman alıcı olmaları ve yüksek oranda manuel işlem gerektirmeleri nedeniyle patojen temeline dayalı hasta yönetimini geciktirmektedir. Bu nedenle, bakteri türlerini hızlı ve doğru tanımlayacak yeni tanısal testlere gereksinim vardır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvar tanı testleri içinde enfeksiyon hastalıkları tanısında kullanılmakta olan moleküler tanı yöntemleri ve özellikle nükleik asit temelli yöntemler, en hızlı ilerleme gösteren alanı oluşturmaktadır. Bu testler zaman içerisinde mikrobiyoloji laboratuvarlarında kültür-temelli, biyokimyasal veya immünolojik yöntemleri tamamlama veya yerini alma rolünü üstlenmektedir. Nitekim ilk kuşak nükleik asit yöntemleri tıpkı konvansiyonel tanı yöntemleri gibi tek bir test sonucu veremekteydi. Teknolojide gerçekleşen ilerleme ve yeni yaklaşımlar, “microarray”, multipleks nükleik asit amplifikasyon teknikleri veya kütle spektrofotometri gibi aynı anda birçok parametreye ait sonuç verebilen yöntemlere olanak sağlanmıştır. Bununla birlikte, bu yöntemler kapalı tüp sistemlerini de kullanıma sokarak hızlı mikrobiyal tanının yanı sıra, kontaminasyon riskinde azalmayı da beraberinde getirmiştir. Başlangıçta moleküler yöntemler mikrobiyal patojenlerin saptanması ve tanımlanmasında rol almış olsa da, yeni teknolojilerle birlikte bu yöntemler beraberinde çoklu antibiyotik direncini belirleyen parametreleri saptama ve genetik düzeyde mikrobiyal epidemiyoloji ve sürveyansı takip etme olanağına da zemin hazırlamaktadır.

Klinik örneğin direkt mikroskopik incelemesi, insana patojen mikroorganizmaların saptanmasında en eski ve aynı zamanda en önemli yöntemler arasında yer almaktadır. Direkt mikroskopi, etkenin tanımlanması için en erken mikrobiyolojik ön tanının belirlenmesinde anahtar rol oynamasına rağmen, bakterinin tür düzeyinde tanısını koymak için mutlaka örneğin uygun besiyerine ekimi ve sonrasında etkenin üretilmesi gerekmektedir. BacTec (Becton Dickinson, ABD), Vitek (bioMérieux, Fransa), Phoenix (Becton Dickinson, ABD) gibi otomatize sistemlerin devreye girmesi ile yöntemlerin standardizasyonu, kalite ve etkinliğinde artış sağlanmasına rağmen, hiç biri saf kültür elde edilme ihtiyacını ortadan kaldıramamıştır.

Moleküler teknikler, bakterinin türe özgül korunmuş gen bölgelerini tanımlayarak bakteriye ait genotipik

özellikleri net olarak vermektedir. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin keşfi, kültüre gerek kalmaksızın mikroorganizmaları hızlı, özgül ve duyarlı olarak saptama, tanımlama ve direnç durumlarını belirleme imkanı sağlamıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) nükleik asit tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. PCR, DNA varlığını saptamaya yönelik bir yöntem olması nedeniyle hem canlı hem ölü hücreden kaynaklanan pozitif test sonucu verebilmektedir. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde nükleik asit kalitesinin yeterli olmaması özgül olmayan primer birleşmesine neden olarak sonucun yanlış değerlendirilmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle, yeni amplifikasyon temelli yöntemler, çoğaltılacak hedef molekülü özgül olarak saptamak ve tanımlamak amacıyla özgül hibridizasyon problemlerini kullanmaktadır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında moleküler yöntemlerin gelişmesi, yeni bir çağın başlamasına ve yanı sıra ekonomik tasarrufa neden olan, akılcı antibiyotik tedavisinin ortaya çıkışını sağlayan, hızlı patojen saptanmasına olanak sağlamasına rağmen, özgül duyarlılık sonuçlarını verememeleri, maliyetlerinin yüksek oluşu ve fenotipik testlerle olan uyumsuzlukları bu yöntemlerin klinik kullanımını kısıtlamaktadır.

Antibiyotik Direncini Saptamada Moleküler Testler

Multipleks ve gerçek zamanlı (real-time) PCR temelli yöntemler

Floresan işaretli problemlerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR), moleküler yöntemlerin önünü açmıştır. Bu yöntem, önceleri aynı test içinde tek nükleotid polimorfizmleri gibi genetik varyasyonları bir seri özgül prob kullanımı ile kantite etme ve genotipleme imkanı veren tek parametrelili testler olarak uygulamaya girmiştir. Çok parametreye dayalı PCR yöntemleri ise, ilk defa kan yolu enfeksiyonlarının tanısında ortaya çıkmış, 40 farklı bakteri ve mantar patojeninin doğrudan kan örneğinden tanımlanmasını sağlamıştır. Böylece, tanısal olarak düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip kan kültürü yönteminin yerini alarak daha duyarlı, daha özgül ve daha kısa sürede örnekten doğrudan mikrobiyal patojenin tanısına olanak doğurmuştur. Bu yöntemler her bir patojen için özgül primer setinin kullanımı sonucu farklı hedeflerin bir tüp içerisinde aynı anda amplifikasyonuna dayalı multipleks PCR prensibine dayanmaktadır. LOOXTER/VYOO (Sirs-Lab, Almanya) ve Septi-Test Blood (Molzyme, Almanya) sistemleri “microarray” ile hibridizasyon veya agaroz jel elektroforez ile özgül PCR ürünlerinin sırayla tanımlanmasını sağlayan konvansiyonel multipleks PCR yöntemleridir. Floresan ve erime eğrisi analizi ile Rt-PCR LightC-

yciler teknolojisine dayalı Septi-Fast (Roche Diagnostics, Almanya) sistemi ise, bakteri tanımlamasını tür veya cins düzeyinde gerçekleştirmektedir. Her üç yöntem de doğru- dan kan örneğinden analiz yapma imkânı sunmaktadır.

GeneXpert

GeneXPert MDRO Assay (Cepheid, ABD), multipleks Rt-PCR temelli bir sistemdir. Rektal sürüntü örneklerinde karbapenemaz üretimini saptamakta; KPC, NDM ve VIM karbapenemaz genlerini tespit etmektedir. Aynı şekilde, Xpert vanA testi rektal sürüntü örneklerinde vankomisine dirençli enterokok araştırmaktadır. Xpert MRSA/SA, Xpert MRDA/SSTI, Xpert MRSA/BC (Cepheid, ABD) ise burun taşıyıcılığı, pozitif kan kültüründe ve deri yumuşak doku enfeksiyonlarında MRSA varlığının belirlenmesi için geliştirilen yöntemlerdir. Xpert MRSA/SA SSTI *spa*, *mecA* ve kromozomdaki *attB* bölgesi olmak üzere üç bölgeyi çoğaltır. Test süresi 50 dakikadır.

GeneOhm StaphSR

Rt-PCR yöntemiyle DNA amplifikasyon prensibine dayalı bu yöntemde *S.aureus* suşlarına özgü bir gen olan *orfX* geni ile *SCCmec* (*Staphylococcus cassette chromosome*) taşınabilir elemanın birleştiği bölgeden bir DNA bölgesi çoğaltılır. MRSA saptanmasında %95 duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir.

LightCycler Septi-Fast M^{GRADE} test

Septi-Fast (Roche Diagnostics, Almanya), 10 farklı bakteriyi tür düzeyinde, yedisini cins düzeyinde, yanı sıra beş *Candida* türü ile *Aspergillus fumigatus*'u tanımlayan kantitatif olmayan Rt-PCR yöntemidir. Bu yöntem özellikle sepsisten %90 üzerinde sorumlu olan ve kültürü yapılabilen 25 mikroorganizmayı tanımlayabilmektedir. Bunlar arasında yer alan gram-negatif bakteriler *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'dır. Kültürü yapılamayan veya zor üreyen mikroorganizmaları tanımlama özelliği yoktur. Septi-Fast, 1.5 ml tam kandan seramik boncuklarla mekanik ekstraksiyon yaparak spin-kolon temelli nükleik asit saflaştırma yöntemi kullanmaktadır. Bu yöntemde, insan DNA'sı patojen DNA'sı ile birlikte izole edilmektedir. Septi-Fast, kan dışında pleural sıvı ve periton sıvısı gibi örneklerde gram-negatif bakterilere bağlı pyojenik enfeksiyonların tanısını koymada hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Septi-Fast, istatistiksel olarak anlamlı şekilde antibiyotik tedavisi alan hastalarda kan kültür sonucuna göre daha yüksek pozitiflik göstermektedir. Diğer yandan, Septi-Fast'in saptayamadığı mikroorganizmaların kültürde saptanması da söz konusu olabilmektedir. Bunun nedeni, kan kültüründe çok daha yüksek kan hacminin kullanımına bağlı izolasyon oranının artması ve Septi-Fast yöntemi ile saptanamayan sepsise neden olan bazı bakteri türlerinin kan kültürü ile tanımlanabilmesidir. Septi-Fast 3-30 cfu/ml gibi düşük sınır mikroorganizma tanımlama imkânı sağlamaktadır. Septi-Fast yöntemi 6 saat gibi kısa sürede

analize olanak sağlamakla birlikte, örnek naklinden test sonucuna kadar geçen süre 27 saati bulmaktadır. Buna rağmen, kan kültürüne göre daha hızlı sonuç vermektedir. Septi-Fast ayrıca, kan kültürüne göre daha az kontaminasyon oranına sahiptir.

SeptiTest

İnsan DNA'sının patojen DNA'sı ile birlikte izole edilmesi PCR için inhibitör etki göstermektedir. MolZym ürünü olan Septi-Test, insan DNA'sını ortadan kaldırmak için DNaz ile muamele etmektedir. Yöntem, mikroorganizma tanısında 16S ribozomal DNA amplifikasyonu ve dizi analizi kullanmaktadır. Septi-Test 50 cfu/ml'e kadar kanda mikroorganizma varlığını saptayabilmektedir. Yöntemin bir dezavantajı, hücre içi yerleşimli bakterilerin insan lökosit DNA'sı yıkımı ile kaybı söz konusudur. Septi-Test, 114 farklı gram-negatif bakteri türünü tanımlayabilmektedir. Bunlar arasında *Acinetobacter*, *E.coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella* ve *Vibrio* türleri bulunmaktadır. Test için örneğin laboratuvara ulaşımı ile sonuç verilmesi arasındaki süre 8-12 saat kadardır. Sonuç verme süresinin uzun olması ve yanlış pozitiflik oranlarının yüksek oluşu hızlı tanı için klinik yararlılığını düşüren özelliklerdir.

Cepheid Hyplex

Hyplex BloodScreen (BAG, Almanya) hem gram-pozitif hem gram-negatif paneli ile 10 farklı bakteri türünü tanımlayabilmektedir. Bu yöntemde bakteriyel DNA'nın multipleks PCR ile amplifikasyonunu takiben, ELISA'ya benzer bir biçimde özgül oligonükleotid problemleri ile kaplı mikropak çukurlarına PCR ürününün hibridizasyonu gerçekleşmektedir. Bu yöntem, pozitif kan kültürlerinde uygulanmakta olup test süresi 3 saat civarındadır. Gram-negatif panelde *E.coli*, *P.aeruginosa*, *E.aerogenes*, *Klebsiella* spp. bulunmaktadır. Farklı bakteri türlerinde % 96.6-100 arasında değişen duyarlılık, % 92.5-100 arasında değişen özgüllük göstermektedir. Hyplex, aynı test temelinde dayalı olarak geliştirilmiş, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, metallo-beta-laktamaz, oxa-karbapenemaz üreten bakterilerin tanımlanmasında ve *Clostridium difficile* tanısında kullanılan ayrı ürün yelpazesine sahiptir. Hyplex CarbOxaID doğrudan kan kültüründe *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58} genlerini, HyplexESBL GSBL genlerini ve Hyplex SuperBugID *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} genlerini saptamaktadır. Hyplex EnteroResist ise, tarama kültürlerinde enterokoklarda *vanA*, *vanB* genlerini saptamaktadır. Hyplex StaphyloResist, MRSA tespitini *mecA* geni tespiti ile yapmaktadır. Test süresi 4.5-6 saattir.

Curetis Unyvero

Multipleks PCR ve prob hibridizasyon sonrası membran üzerine aktarma tekniğine dayanmaktadır. Bu yöntem solunum yolu örneklerine uygulanmakta olup, 17 bakteri ve 22 antibiyotik direnç genini saptayabilmektedir. Beta-laktamazlar dışında makrolid direnç genlerini, florokinolon direnç mutasyonlarını ve integronları tespit edebilmektedir.

FilmArray

FilmArray (BioFire, ABD), gram-negatif kan kültür testi olup “nested” multipleks PCR amplifikasyonu tekniğine dayanmaktadır. Toplam 27 patojeni ve üç antibiyotik direnç genini saptayabilmektedir. Bu yöntemle *bla*_{KPC}, *vanA* ve *vanB*, *mecA* direnç genleri belirlenebilmektedir. Yöntemin sonuç verme süresi 1 saattir.

“Microarray” yöntemleri

Özgül hibridizasyon problemlerinin katı bir faza tutturularak işaretli hedef molekülleri saptamaya yönelik olan katı faz hibridizasyon yöntemi, ilk kullanıldığında mikropalak çukurlarında immobilize edilen özgül problemlerin tek bir parametreyi saptama ve tanımlamasına yönelik olarak geliştirilmiştir. Daha sonra çoklu problemlerin nitroselülöz veya naylon membranlara tutturulması ile “macroarray” yöntemleri ortaya çıkmıştır. “Microarray”lerin 200-300 µm çapından daha küçük noktalar halinde hazırlanması ile bakteriyel menenjit, solunum sistemi enfeksiyonu ve endokardit gibi hastalıkların tanısında hızlı, duyarlı ve özgül tanı imkanı doğmuştur.

LOOXTER/VYOO

SIRS-Lab ürünü olan LOOXTER/VYOO, insan DNA’sı ile bakteri DNA’sı arasındaki metilasyon farkı nedeniyle afinite kromatografi tekniği ile patojen DNA’sını yoğunlaştırarak 16S rDNA amplifikasyonu yapan bir yöntemdir. Yöntem, %90 oranında ökaryotik DNA’yı uzaklaştırma imkanı sağlar. Amplifikasyonu takiben uygulanan “microarray” yöntemi PCR sonuçlarını okuyarak patojenleri tür düzeyinde tanımlamaktadır. Test için kullanılan kan örnek hacmi 5 ml olan LOOXTER/VYOO, 34 farklı bakteri, altı *Candida* türünü, *Aspergillus fumigatus* ile beş farklı antibiyotik direnç determinantını tanımlayabilmektedir. Yöntemin tanımladığı gram-negatif bakteriler arasında *A.baumannii*, *Bacteriodes fragilis*, *Burkholderia fragilis*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *E.coli*, *Haemophilus influenzae*, *K.oxytoca*, *K.pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Neisseria meningitidis*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa*, *S.marcescens*, *S.maltophilia*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia* ve *Prevotella melaninogenica* bulunmaktadır. Yöntem 8 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve örnekte 3-30 cfu/ml düzeyinde bulunan patojeni tanımlama duyarlılığı göstermektedir. Bu test aynı zamanda, SHV tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları, *mecA*, *vanA* ve *vanB* genlerini saptayarak antibiyotik direnci hakkında bilgi verebilmektedir.

Prove-it Sepsis

Prove-it Sepsis (Mobidiag, Finlandiya), multipleks PCR ve “microarray” temeline dayalı olan yöntem 60 bakteri, 13 mantar türü ile *mecA-vanA/B* direnç genlerini tanımlama özelliğine sahiptir. Tanımlamada gram-negatif bakteriler arasında *A.baumannii*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *E.coli*, *H.influenzae*, *Kingella kingae*, *K.oxytoca*, *K.pneumoniae*, *N.meningitidis*, *P.mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *P.aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S.marcescens*, *S.maltophilia*, *B.fragilis* ve *Campylobacter jejuni* yer almaktadır. Klinik olarak şüpheli sepsis tanısı olan 3318 hastada yapılan bir araştırma-

da, Prove-it Sepsis % 94.7 duyarlılık, % 95.7 özgüllüğe sahip bulunmuştur. Bu yöntem pozitif kan kültür örneklerinde analiz yapma imkanı sunmaktadır. Yöntemin sonuç verme süresi 3.5 saattir.

Verigene

Verigene (Nanosphere, ABD), PCR amplifikasyonunu takiben altın nanopartikül ile konjuge problemlara hibridizasyon tekniğine dayanmaktadır. Yöntem 20’den fazla bakteriyi ve altı farklı antibiyotik direnç genini saptayabilmektedir. Yöntemin sonuç verme süresi 2.5 saattir.

Proteomik temelli teknolojiler

MALDI-TOF MS (Matrix-Associated Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry), bakterileri proteomik profillerini belirleyerek tanımlamaktadır. Bunun yanı sıra, bakteri virülans faktörleri veya antibiyotik direncini de tanımlayabilme özelliğine sahiptir. Birkaç dakika içinde izole edilen mikroorganizmanın tanımlanması veya tiplendirilmesi gerçekleştirilebilmektedir. Kültür sonrası bakteri tanımlanmasında %95.4 oranında duyarlılık göstermektedir. Kısıtlayıcı özelliği, doğrudan klinik örnekler üzerine uygulanamaması ve analiz için bakterinin kültürüne ihtiyaç duyulmasıdır. Son derece pahalı olması rutin kullanımını engellemektedir. Ancak kütle spektrofotometrik teknikler, nükleik asit temelli yöntemler ile birlikte kullanılarak amplikonların hızlı dizi analizi sonucuna ulaşılmasını sağlayabilmektedir. MALDI-MS veya ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrophotometry) bu amaçla kullanıma girmeyi vadeden yöntemlerdir. MALDI Biotyper/Sepsityper (Bruker, Finlandiya) benzer şekilde, gram-pozitif bakterilerin yanı sıra non-fermentatif bakteriler, *Enterobacteriaceae* ve diğer gram-negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanılan yeni, hızlı, duyarlı ve ekonomik yeni moleküler rutin tanımlama yöntemidir.

Amplifikasyona dayalı olmayan nükleik asit temelli yöntemler

Kültür pozitifliği sonrasında, bakterinin konvansiyonel fenotipik testlerden daha hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlayacak moleküler yöntemlerden biri de peptid ve/veya nükleik asit problemleri ile tanısının konulmasıdır. “Fluorescent-labeled peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization” (PNA-FISH) (AdvanDx, ABD), DNA’yı taklit eden floresan ile işaretli peptid nükleik asit moleküllerinin kullanılması ile bakterilerin rRNA genlerini hedefleyen problemlerden oluşmaktadır. Bu problemler klasik DNA problemlerine göre daha güçlü hibridizasyon özelliği göstermektedir. Konvansiyonel FISH yöntemine benzer şekilde amplifikasyon basamağını atlayarak mikroorganizmaları rRNA genlerini tespit ederek saptayabilmektedir. Gram-negatif bakteriler için *E.coli* ve *P.aeruginosa* gibi sınırlı sayıda bakteriyi tanımlayan floresan in situ hibridizasyon temelli yöntem, 3 saat gibi kısa sürede test sonucu verebilmektedir.

Sonuç olarak, hızlı moleküler tekniklerin rutin bakteriyoloji laboratuvarında kullanımı, bu yöntemlerin doğrudan klinik örnekten bakteriyel patojenin saptanmasına

yönelik hızlı ve duyarlı sonuç vermeleri nedeniyle, yeni bir çağın başlamasına yol açmıştır. Ancak, antimikrobiyal direnci yansıtan bu testlerin sayısı oldukça azdır. Günümüz koşullarında rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mevcut sistemlerin kullanımı, yüksek maliyetleri, gerçek patojeni tespit edebilme güçlükleri, fenotipik ve genotipik direnç uyumsuzlukları nedenleri ile kısıtlıdır.

Kaynaklar

- Buchan B, Riebe KM, Ledebner NA. Comparison of the MALDI Biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2):346-52.
- Ecker DJ, Sampath R, Li H, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infection. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10(4):399-415.
- Gaibani P, Rossini G, Ambretti S, et al. Blood culture systems: rapid detection-how and why? *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34(Suppl 4):513-5.
- Gebert S, Siegel D, Wellinghausen N. Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MolYsis. *J Infect* 2008; 57(4):307-16.
- Hansen WL, Beuving J, Bruggeman CA, Wolffs PF. Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2010; 48(12): 4432-8.
- Hansen WL, Bruggeman CA, Wolffs PF. Evaluation of new preanalysis sample treatment tools and DNA isolation protocols to improve bacterial pathogen detection in whole blood. *J Clin Microbiol* 2009; 47(8):2629-31.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34(6):1589-96.
- Laakso S, Kirveskari J, Tissari P, et al. Evaluation of high-throughput PCR and microarray-based assay in conjunction with automated DNA extraction instruments for diagnosis of sepsis. *Plos One* 2011; 6(11):1-8.
- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197(3):313-24.
- Lilienfeld-Total M, Lehmann LE, Raadts AD, et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009; 47(8):2405-10.
- Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(6):2252-8.
- Mancini N, Carletti, Ghidoli N, et al. The era of molecular and other non-culture based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1):235-51.
- Morgan M, Marlowe E, Della-Latta P, et al. Multicenter evaluation of a new shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization procedure for species identification of select gram-negative bacilli from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2010; 48(6): 2268-70.
- Muhl H, Kochem AJ, Disque C, Sakka SG. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(1):41-9.
- Pence MA, McElvania TeKippe E, Burnham CA. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. *Clin Lab Med* 2013; 33(3): 651-84.
- Sancho-Tello S, Bravo D, Borrás R, et al. Performance of the LightCycler SeptiFast test Mgrade in detecting microbial pathogens in purulent fluids. *J Clin Microbiol* 2011; 49(8): 2988-91.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49(4):543-51.
- Simons G. Applications of nucleic acids technologies in molecular diagnostics; multiplex assays in real-time format. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10(7):853-5.
- Tissari P, Zumla A, Tarkka E, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet* 2010; 375(9710):224-30.
- Tuite N, Reddington K, Barry T, et al. Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in gram negative bacteria: is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother* 2014. [Epub ahead of print]
- Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394(3):731-42.
- Wellinghausen N, Kochem AJ, Disque C, et al. Diagnosis of bacteremia in whole blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9):2759-65.
- Wellinghausen N, Nöckler K, Sigge A, et al. Rapid detection of *Brucella* spp. in blood cultures by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5): 1828-30.
- Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, et al. Evaluation of the Hyplex bloodscreen-multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):3147-52.
- Won H, Rothman R, Ramachandran P, et al. Rapid identification of bacterial pathogens in positive blood culture bottles by use of a broad-based PCR assay coupled with high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 2010;48(9):3410-3.

DNA BARKODLAMA

Prof. Dr. Çağrı ERGİN

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

Son yıllarda biyolojik bilimlerde hızlı ilerleyen teknolojiye bağlı olarak daha kolay, daha hızlı ve daha ucuz veri elde edilebilmektedir. Bilgisayarların karmaşık veri analizlerinde kullanımı ile sistematığı sağlamayan biyolojik problemler ve sağlık ile ilgili konular araştırılmaktadır. Bu konudaki en belirgin örneklerden birisi, ekosistem ve biyolojik çeşitlilik göz önüne alındığında DNA barkodlamadır.

Çoğunluğu bakteri, arkea ve tek hücreli ökaryot olan mikrobiyal dünyanın %99'unun çeşitliliği hakkında yeterince bilgimiz bulunmamaktadır. Klasik yöntemler ile türler arasındaki farklılıkların ortaya konması imkansız iken, DNA genomunu temel alarak analiz yapan yöntemler, özellikle de DNA dizi verilerini içeren barkodlama ile hız kazanmıştır. Mikrobiyolojik incelemelerde türler arasındaki ilişkinin ortaya konmasında karşılaşılan zorluklar yeni uygulamaya giren yöntemler ile (metagenomiks, metatranskriptomiks, metametabolomiks, metaproteomiks ve tek hücre sekanslama-barkod) ile aşmaya başlanmıştır. DNA barkodlama ile yapılan mikrobiyolojik araştırmalar son 10 yıl içinde hızla artmıştır. Mikrobiyolojide DNA barkodlama diğer yöntemlere göre daha maliyet-etkin ve yeni araştırmalara daha açıktır.

Genetik çeşitlilik cinsler arasında değişkendir. Mikroorganizmaların belirlenmiş kısa DNA dizileri (bunlar genellikle bir gene özgüdür) mikrobu barkodu olarak kullanılır. Bu gen, hayvanlar için *COI* geni (mitokondriyal sitokrom c alt-ünite 1, yaklaşık 650 bazçifti uzunluğunda) iken bitkilerdeki plastid belirleyici genlerdir. Teorik olarak 400-800 bazçifti (bç) uzunluğundaki standardize edilmiş DNA dizisi, dünyadaki tüm canlıların tanımlanmasına yeterlidir. Bununla birlikte, genel olarak DNA barkodlamada ana hedef alınan yapının genellikle tek bir mitokondriyal DNA gen bölgesi olması, gen transferleri, tamamlanmayan gen dizilimleri, gen seçimi, psödogenler, dublikasyon ve delesyonlar gibi farklılaşmaya neden olan değişimlerin sık görülmesi ile önemli bir sorun oluşturmaktadır. Biyolojik değişkenliğin çok olduğu canlılar aleminde henüz veri tabanı oluşturma çalışmaları devam etmektedir. Bu sorunların bilinmesine rağmen araştırmalar bu teknikte hızla ilerlemiş, analitik ve istatistiksel yöntemler ile bu sorunlar aşmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak uluslararası konsorsiyumlarda kabul edilen barkodlar oluşturulmaya başlanmıştır. Tek bir gen üzerinde yer alan değişmeyen ve tekrarlayan bölgelerin moleküler tanımlamada sıklıkla kullanılması intraspesifik varyasyonlardan, interspesifik farklılıkları ayırmada yetersiz kalabilmektedir. *COI* bölgesinin 5' ucundan başlayan bölge birçok canlıda farklı primerler ile çoğaltılabildiğinden barkod uygulamalarında

hedef seçilmiştir. Ancak, tür seviyesinde belirgin genetik ve varyasyon seviyesine sahip olan, universal primerler geliştirmeye uygun korunmuş uç bölgeleri bulunan ve ekstraksiyon ile PCR sırasında sorun oluşturmayacak kadar kısa dizi uzunluğuna sahip bölgeler de hedef seçilebilir.

DNA barkodlamanın efektif kullanımı, kullanılan yöntem ve eşleştirilen veritabanı temellerine bağlıdır. Elde edilen verilerin analizinde farklı yöntemler kullanılmakla birlikte (NJ-bazlı, uzaklık-bazlı, eşleştirme, vb) henüz türlerin içindeki tanımlamaların veritabanı ile eşleştirilememesi sorunu bulunmaktadır. Veritabanının yetersizliği, algoritmada ideal eşik seviyesinin saptanamaması ile geleneksel ve yeni yöntemler arasında taksonomik birlikliğin bulunmadığı durumlar DNA barkodlamanın bugün için ana sorunlarıdır. Genel olarak algoritmalar GenBank ve BOLD (Barcode of Life Database) veritabanlarını kullanılmaktadır.

DNA, son iki dekat içinde bakteriyolojik taksonomide kullanılmaktadır. Morfoloji, genom veya DNA temelli çalışmalar genetik ve ekolojik değişkenliğin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır. DNA-DNA hibridizasyonu bakteri tanımlamada, genoma yönelik teknikler ise yeni türlerin tanımlanmasında kullanılmıştır. Ancak bakteriyel filogeni ve taksonomi araştırmalarına 16S *rRNA* geni tanımlamada daha ön plandadır. Bu gen hemen hemen tüm bakterilerde bulunur. Aynı zamanda bu genin fonksiyonu genellikle değişken değildir ve gen inforatik çalışmalara yetecek kadar (1500 bç) uzundur. *Şaperonin-60* (*GroEL*, *Hsp60*) ve *rpoB* genleri de bakteriyel barkod olabilecek diğer yapılardır. Tür seviyesinde *ITS1*, *ITS2*, *18S RNA* ve *28S RNA* gibi moleküler belirleyicilerin de barkodlamada kullanılabileceği bildirilmiştir. Bakteriyel ortamda biyoçeşitlenmenin yaşamın sürekliliğinin gereği olması nedeniyle, çeşitlilik bulundurmayan genlerin saptanması zordur. *COI* temelli bakteriyel DNA barkodlamada 20'den fazla patojen için barkodlama yapılabilmektedir. Aynı zamanda antimikrobiyal tedaviyi yönlendirecek barkod geliştirilmesi yönünde de araştırmalar bulunmaktadır.

Viruslarda moleküler çeşitliliğin ve dinamizmin doğal bir süreç olması, barkod araştırmalarını zorlaştırmaktadır. Çalışmalar özellikle insan patojeni viruslar üzerine yoğunlaşmışsa da, bugün için özgül bir belirleyici bölge saptanmamıştır. İnsan enterovirusu, hayvanlarda ekonomik öneme sahip mavidil virusu ve avian influenza virusu biyolojik diğer belirteçlerle birlikte (biobarkod amplifikasyonu, floresans DNA barkod immün ölçüm, vb) tanımlanmaya çalışılmaktadır.

Mikolojik etkenlerin tür esasında tanımlanmasında DNA barkodlamada *COI* (grup 1 intron içeren bölgesi),

SSU rRNA, *ITS* dizileri (ribozomal sistron içinde), *LSU* (*28S LSU rDNA* gibi), *rRNA*, *ribozomal polimeraz 1 (RPB1)* ve *RPB2* ve *RuBisCO* geni kullanımı önerilmiştir. Patojen mantarların çeşitliliğini, ekolojik rollerini ve coğrafi dağılımını anlayabilmek için DNA barkodlama çalışmalarının çok önemli olduğu düşünülmektedir.

Protozoonlar içinde amipler gibi basit morfolojik özelliklerin bulunması ve buna bağlı tanımlamalarda taksonomik çeşitliliğe gidilememesi önemli bir sorun olarak bulunurken, DNA barkodlamanın bu sorunu çözmede yardımcı olabileceği düşünülmüştür. *COI*, *18S rRNA*, *28S rRNA* ve *ITS* genleri bugün için barkodlamada kullanılabilirliği düşünülen genlerdir.

DNA barkodlamanın kısa süre içinde hızla ilerlemesine rağmen, aşağıda belirtilen bazı kısıtlılıkları da bulunmaktadır:

1. Barkod belirleyici olarak seçilen dizi bölgeleri, türler arasında veya cins içinde tanımlama esnasında örtüşen (overlap) veri bölgelerine sahip olabilmektedir.
2. Uygun DNA belirleyici bölgenin seçimi ve karşılaştırılacağı veritabanı karmaşıktır; aynı tür için farklı DNA belirleyiciler tanımlanmaktadır. Hangi bölgenin barkod olarak uygun olduğuna karar verilememektedir.
3. Morfolojik tanımlama sorunları nedeniyle tür olarak aynı gruba dahil edilen bazı mikroorganizmalar hayat döngüleri esnasında farklılıklar göstermektedir. Çevresel veya flora gibi karışım halinde bulunmaları durumunda sınıflandırılmamaktadır. Bu durumlarda incelenen mikroorganizma tür içinde sınıflandırılabilirken barkod ile karşılığına karar verilememiştir.

Sonuç olarak DNA barkodlama, taksonomik çalışmalarda, popülasyon genetiğinde, filogenetikte ve veri analizi ile teorik yöntemlerin birleşimine dayalı uygulamalı gelişimini içeren “computational” biyoloji için kullanılabilircektir. Bilimsel toplantılarda karşıt görüşlerin varlığı ile birlikte barkodlama çalışmalarının devam etmesi gerektiğine dair yaklaşımlar öne çıkmaktadır.

Kaynaklar

- Aravind K, Ravikanth G, Shaanker RU, et al. DNA barcoding: an exercise in futility or utility? *Current Science* 2007; 92: 1213-6.
- Chapple DG, Ritchie PA. A retrospective approach to testing the DNA barcoding method. *PLoS One* 2011; 8: e77882.
- Charakborty C, Doss CG, Patra BC, Bandyopadhyay S. DNA barcoding to map the microbial communities: current advances and future directions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 3425-36.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 2003; 270: 313-21.
- Kress WJ, Erickson DL. DNA Barcodes: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, Vol 858, 2012. Humana Press, New York.
- Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 2761-2.
- Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol* 2005; 3: e422.
- Pacheu-Grau D, Gómez-Durán A, Iglesias E, et al. Mitochondrial antibiograms in personalized medicine. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 1132-9.
- Segata N, Boernigen D, Tickle TL, et al. Computational metaomics for microbial community studies. *Mol Syst Biol* 2013; 9: 666.
- Tanabe AS, Toju H. Using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLOS One* 2013; 8: e76910.

GALAKTOMANNAN VE BETA-GLUKAN TESTLERİ İÇİN KLİNİK ÖRNEK SEÇİMİ: SERUM MU, BAŞKA ÖRNEK(LER) Mİ?

Doç. Dr. Gökhan METAN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Invazif mantar enfeksiyonları (İME), başta hematolojik maligniteli hastalar olmak üzere kök hücre ve solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda artan sıklıkla karşılaşılan, yüksek mortalite ve morbidite oranları ile seyreden bir klinik tablodur. Günümüzde İME'nin erken ve doğru tanısı için üzerinde çalışmaların en yoğun olarak sürdürüldüğü yöntemler, galaktomannan (GM) antijen testi ve 1,3 β-D gluklan (BDG) testleridir. GM, *Aspergillus*'un hücre duvarına özgü bir polisakkariddir. Yapısı, alfa-mannoz rezidülerinden oluşan bir temel zincir ve kısa β(1,5)-galaktofuranoz rezidülerinden oluşan yan zincirlerden oluşmaktadır. *Aspergillus* enfeksiyonları nötropenik hastalarda invazif seyreder. Özellikle damarsal yapılara karşı afinitesi vardır ve çevre damarları invaze etmesiyle birlikte ürettiği ortama GM antijeni salınır. GM antijeni saptanmasında ilk yıllarda lateks aglütinasyon testi kullanılmış, fakat düşük duyarlılığı nedeniyle ilerleyen yıllarda yerini tamamen enzim temelli immünolojik yöntemlere (ELISA) bırakmıştır. BDG ise *Mucorales* ve *Cryptococcus neoformans* dışındaki birçok patojenik maya ve filamentöz mantarların hücre duvarında yer almaktadır. BDG saptanmasında kullanılan üç ticari kit; Fungitell (Associates of Cape Cod Inc., ABD), FungiTec G (Seikagaku Kogyo Corporation, Tokyo) ve türbimetrik test Wako-

WB003 (Waco Pure Chemical Industries, Osaka) olup, bunların test prensibi birbirine benzerdir. Testlerin tümünün yaygın özelliği BDG'nin 'horseshoe crab' (atnalı yengeci) hemolenfinden kaynaklanan amebositlerde koagülasyon kaskadını aktive etme yeteneğidir. 'Horseshoe crab' lizat ilk kez limulus testi kullanılarak endotoksin saptamak için kullanılmış ve 'horseshoe crab'ın bir tipi *Limulus polyphemus* olarak adlandırılmıştır. Endotoksin, faktör C olarak adlandırılan bir serin proteaz zimojen yoluyla koagülasyon kaskadını eyleme geçirir. Sonradan BDG ikinci bir serin proteaz enzimi olan faktör G aracılığıyla faktör C'den bağımsız olarak koagülasyon kaskadını aktive eder. Testlerin farklılığı büyük oranda kullanılan at nalı yengecindeki farklılıktır. Batı dünyasında yaygın olarak kullanılan test Fungitell testidir. GM ve BDG testlerinin temel özellikleri tabloda özetlenmiştir.

GM testinin üretici firma önerileri incelendiğinde testin serum, bronş lavajı ve bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvılarında yapılması önerilirken, birçok merkezde GM testinin plazma örneklerinden yapıldığı dikkat çekmektedir. Testin serum ve plazmadaki performansını karşılaştıran çalışma sayısı çok azdır. Santral sinir sistemi aspergillozu olgularında beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda GM antijen

Tablo. Galaktomannan ve 1,3-beta-D-glukan testlerinin temel özellikleri

	Galaktomannan	(1,3)-β-D-glukan
Tanı kapsamı	<i>Aspergillus</i> ^a	Panfungal ^b
Yöntem	Sandviç ELISA Lateks aglütinasyon	Kalorimetrik
Ticari kit	Bio-Rad (Fransa) Pastorex Aspergillus (Fransa)	Fungitell (ABD) Fungitec-G MK (Japonya) Wako (Japonya) Maruha (Japonya)
Sınır değer (serum) BAL	0.5-1.5 indeks 0.5-1 indeks	Fungitell 80 pg/mL Diğerleri 11-20 pg/mL
Erken tanı	5-8 gün	3-10 gün
Serum, plazma		
• Duyarlılık (D)	%29-100	%47-98
• Özgüllük (Ö)	%20-100	%86-98
BAL (D,Ö)	%56-100, %76-100	?
Uygulama süresi	Aynı gün	Aynı gün
Tedavi izleminde kullanılabilme	+	Ø
Maliyet	+	++

^a*Penicillium*, *Histoplasma capsulatum* ve *Fusarium*'a bağlı pozitif sonuçlara dikkat edilmeli

^b*Mucorales* ve *C. neoformans* hariç

testi ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir. İdrar örnekleri görece olarak daha yüksek oranda yalancı pozitif sonuç vermesi nedeniyle klinik kullanımda tercih edilmemiştir.

BDG (Fungitell) için üretici önerisi serum örneğidir. Son yıllarda BAL sıvısı, periton mayii ve BOS'da gerek invazif aspergilloz gerekse invazif kandidiyaz tanısında etkin olduğuna dair olgu örnekleri veya olgu serileri yayımlanmıştır. Bu sunumda testlerin farklı klinik örneklerde İME tanısındaki etkinliği tartışılacaktır.

Kaynaklar

- Ginocchio F, Verrina E, Furfaro E, et al. Case report of the reliability of 1,3-b-D-glucan monitoring during treatment of peritoneal candidiasis in a child receiving continuous peritoneal dialysis. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19:626-7.
- Hoening M, Prattes J, Spiess B, et al. Performance of galactomannan, beta-D-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture and PCR tests for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2014 [Epub ahead of print]
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609-22.
- Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, Kedzierska J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosis of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1→3)-beta-D-glucan antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:755-766.
- Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004; 39:1467-74.
- Lyons JL, Roos KL, Marr KA, et al. Cerebrospinal fluid (1,3)-b-D-glucan detection as an aid for diagnosis of iatrogenic fungal meningitis. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1285-7.
- Marty FM, Koo S. Role of (1-3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2009; 47 (Suppl 1): S233-40.
- Theel ES, Jespersen DJ, Iqbal S, et al. Detection of (1, 3)-b-D-glucan in bronchoalveolar lavage and serum samples collected from immunocompromised hosts. *Mycopathologia* 2013; 175: 33-41.
- Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, et al. Aspergillus galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1496-9.

MİKOLOJİDE MALDI-TOF UYGULAMALARI

Doç. Dr. Işın AKYAR

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

MALDI-TOF Yöntemi ile Mantarların Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması

Fırsatçı patojenlere bağlı invazif fungal enfeksiyonlar önemli morbidite ve mortalite nedenleridir. Son yıllarda fungal enfeksiyonlardaki artış, geniş spektrumlu antibakteriyel ajanların yaygın kullanımına, yoğun bakım hastalarının uzun süre hastanede kalmalarına ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerin sayılarının artması ile bağlantılıdır. Ticari mikolojik tanımlamaların bazı dezavantajları bulunmaktadır. Mantarların doğru tanımlanması makroskopik ve mikroskopik olmak üzere yapısal özelliklerine dayanarak sıklıkla yavaş, zaman zaman çok fazla güvenilirliği olmayan ve ciddi deneyim gerektiren yöntemlerdir. Ayrıca, ticari bazı biyokimyasal test sistemleri sıklıkla izole edilen mayaların kesin tanısını koyabilmekte, ancak nadir rastlanan türlerin tanısında sorun yaşanmakta; tanı konamamakta ya da yanlış tanımlama yapılabilmektedir.

Dikkat edilecek bir diğer konu da bu testler için örneklerin 1-3 gün süre ile inkübe edilmesi gerektiğidir. Biyokimyasal tanımlama yöntemlerinin uyumsuzluklarının üstesinden gelebilmek amacıyla nükleik asit bazlı testler geliştirilmiştir. Bu testlerde rRNA genleri veya "internal transcribed spacer" (ITS) bölgesi gibi hedef bir geni çoğaltıp dizileme işlemi yapılır. Bazı türler yalnızca DNA dizi analizi ile tanımlanabilmekte, yapısal olarak birbirlerinden ayırd edilememektedir. Bu nedenle multilokus DNA dizi incelemesi, bu mikroorganizmaların kesin olarak tanımlanmasında önerilen bir yaklaşımı simgelemektedir. Bununla birlikte, filamentöz yapıli mantarlarda DNA dizi analizine dayalı tanımlamalar aşağıda belirtilen parametreler ile kısıtlıdır:

- Küf hücrelerinin erimeleri zor olduğu için DNA saflaştırma işleminin düşük düzeyde olması,
- PCR inhibitörlerinin varlığı,
- DNA dizi veritabanlarında tanımlanmamış dizilerin varlığı,
- Dizi analizi için gereken maliyet ve zaman yetersizliği.

Yalnızca bazı klinik laboratuvarlar mikroorganizma tanımlamalarında rutin olarak doğrudan maliyet ve uygulama şartlarının uygunluğunu gerektiren moleküler bir yol izlemektedirler. Biyokimyasal ve genom-bazlı tanı yöntemlerine alternatif olarak, kütle spektrumunun proteomik olarak incelemesi birçok mikroorganizmanın tür tanımlamasında kullanılabilir. Son zamanlarda klinik mikrobiyolojide "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry" (MALDI-TOF) yöntemi ile mikroorganizma tanımlamaları büyük önem kazanmıştır. MALDI-TOF MS gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler,

mikobakteriler, küf ve maya türlerinin tanımlanmasında hızlı ve kesin tanı sağlayan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntem, kullanımı kolay, hızlı, maliyet-etkin ve hergün uygulanabilen bir yöntemdir. Tekrarlanabilen, türe-özü spektrum kalıplarını içermektedir. Bu yöntem başta ribosomal proteinler olmak üzere mikroorganizma içeriğini incelemek ve mikroorganizmanın parmak izi olarak anılan bir spektrum oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. MALDI-TOF MS yöntemi ile bir mikroorganizmanın tanımlanması bu mikroorganizmaya ait spektrumun spektra referans kütüphanesindeki verilerle karşılaştırılarak ve karşılığının bulunarak tanımlanması esasına dayanmaktadır. Mikoloji alanında MALDI-TOF MS deneyimleri çok fazla olmamakla birlikte, yapılan bazı çalışmalarda özellikle de agar plaklarında üreyen mantar kolonilerinin tanımlanmasında bakteri tanımlanmasına benzer bir yarar sağlayabileceği gösterilmiştir. Mikrobiyal tanımlama amaçları için bir referans kütüphane kurulması sırasında birçok araştırmacı bir örneğin birçok sayıda çalışılmış bireysel spektralarını içeren ve zaman zaman "metaspektra" zaman zaman da "süperspektra" olarak adlandırılan referans kütle spektrası kullanmıştır.

Klinik örneklerle yapılan bazı çalışmalarda, maya ve küf klinik örnekleri MALDI-TOF MS ve ticari yöntemlerle incelenerek karşılaştırılmış, tür ya da cinsler arasında tanımlamada farklılıklar yaşandığında varyasyonları ayırtıli gösterebilen ITS-2 dizi analizi çalışılmıştır. Bu çalışmalarda ticari maya tanımlama yöntemleri ile MALDI-TOF MS arasındaki korelasyon oldukça yüksek bulunmuştur (%100 cins ve % 99.2 tür düzeyinde). Bulunan az sayıda farklılık ITS-2 dizi analizi çalışılarak kontrol edilmiş ve MALDI-TOF tanımlamasını doğrulamıştır. Küflerdeki korelasyon mayalardaki kadar başarılı değildir. Yapılan bir çalışmada izolatların %68.7'si cins düzeyinde, %40.6'sı ise tür düzeyinde korelasyon göstermiştir. Bu nedenle, fungal tanımlamada konvensiyonel yöntemler ile MALDI-TOF MS arasındaki korelasyon, bütünüyle değerlendirildiğinde tür düzeyinde %87, cins düzeyinde de %93.5 olarak saptanmıştır. MALDI-TOF yöntemi ile mantar tanımlamaları, kısa sürede sonuçlanmakta, özellikle mayalarda yüksek güvenilirlik sağlamakta, ayrıca hem biyokimyasal tanımlama sistemlerine hem de Sabouraud agar gibi çok sık kullanılan besiyerlerine göre oldukça pahalı olan kromojenik agar besiyerlerine gereksinim göstermemektedir.

Maya Türlerinde MALDI-TOF Yöntemi ile Yapılan Tanımlama Çalışmaları

Candida türleri hastane ile ilişkili dolaşım yolu enfeksiyonlarının dördüncü en sık nedenidir ve *Cryptococcus*

neoformans da HIV ile enfekte hastaların mantarla ilişkili en sık ölüm nedenidir. *Candida albicans* hala tüm *Candida*-ilişkili dolaşım yolu enfeksiyonlarının yarısından fazlasını oluşturmakla birlikte *C. albicans* dışı *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* ve *Malassezia* türlerinin sayılarında artış saptanmaktadır. Amfoterisin B ile sağaltım bu organizmalar için uygun, diğerleri için yetersiz olabilmektedir. Birçok *Candida* türü flukonazole duyarlı olmakla birlikte, *C.glabrata*, *C.krusei*, *Rhodotorula* spp. ve bazı *Trichosporon* türleri gibi daha dirençli organizmaları ayırdetmek önemlidir. Ayrıca, *Rhodotorula* türlerinin vorikonazole doğal bir direnci bulunmaktadır ve *Trichosporon*, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* ekinokandinlere intrinsik olarak dirençlidir. Bu organizmaların yalnızca tedavileri değil, laboratuvarında kullanılan standart tanımlama yöntemleri de bazı zorluklar göstermektedir.

MALDI-TOF MS ile yapılan çalışmalarda, 12 farklı türde maya tanımlamalarında herhangi bir büyük hata olmaksızın %85 oranında doğruluk olduğu gösterilmiştir. Uygun spektra elde edilebilmesi için, inceleme öncesinde bir saflaştırma yöntemi kullanımının gerekli olduğu saptanmıştır. Toplam 10-40 dakika içerisinde mayaların büyük bir çoğunluğuna bu yöntem ile hızlı, güvenilir, maliyet-etkin tanı konulabilmektedir. *C.albicans* ile *C.dubliniensis*; *C.guilliermondii* ile *C.kefyr*; *C.metapsilosis*, *C.orthopsilosis* ile *C.parapsilosis* gibi birbirine çok yakın olan türlerin ayırımı yapılabilmektedir. Artrokonidyal maya tanımlamalarında da MALDI-TOF MS yöntemi %98 oranında başarılı olmuştur. Yapılan bir çalışmada askomiçetöz (n=72; *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Saprochaete* ve *Magnusiomyces* spp.) ve basidomiçetöz mayalar (n=147; *Trichosporon* ve *Guehomyces* spp.) tür düzeyinde saptanmıştır. Suşların çoğu iyi skor ile (>2) okunmuştur. MALDI-TOF MS ile yapılan karşılaştırma çalışmaları ticari sistem tanımlamaları ile karşılaştırıldığında başarılı bulunmuştur. Genişletilmiş veritabanı olan MS cihazlarında tanımlama oranı %100'e kadar çıkabilmiştir.

Küf Türlerinde MALDI-TOF Yöntemi ile Yapılan Tanımlama Çalışmaları

Küfler, özellikle de *Aspergillus* türleri, yukarıda belirtilen risk grubunda daha sık rastlanır hale gelmiştir. Küflerin klinik laboratuvarında tanımlanmaları kolonilerin mantar besiyerlerinde makroskopik ve mikroskopik incelenmesi esasına dayanmaktadır. Çok deneyimli mikologların varlığına gereksinim gösteren yavaş ve kompleks bir işlemdir; deneyimli referans laboratuvarlarında bile yanlış tanımlamalar olabilmektedir. *T.rubrum* gibi *Trychophyton* cinsi içerisinde yer alan bazı türlerde MALDI-TOF MS tüm izolatları cins düzeyinde tanımlayabilmektedir. Bununla birlikte, *T.tonsurans* gibi aynı cins içerisinde bulunan diğer türlerin protein profilleri çok zayıf olarak saptanabilmektedir ve bu nedenle tanımlama sonuçları çok düşük skorlar göstermektedir. Bu da cins düzeyinde bile güvenilir sonuçlar elde edilmesini engelleyebilmektedir. *T.rubrum* ile yapılan çalışmalar daha iyi sonuçlar vermekle birlikte *T.tonsurans* ile yapılan çalışmalarda kıyaslama yapmak daha zor olmuştur. Aynı cins içerisinde bile olsa bu heterojenite, küflerin karmaşık protein profilleri ile ilişkilidir. Bu nedenle, tüm bu olasılıkları sunabilen daha

geniş veritabanları içeren sistemler, büyük bir olasılıkla tanımlamanın etkinliğini artıracaktır. Daha iyi sonuç elde edebilmek için ayrıca, kullanılan saflaştırma yöntemlerinin daha etkin hale getirilmesi ve optimize edilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, eğer tanımlama skoru cins ya da tür düzeyinde 1.7'nin üzerinde ise, tüm olgularda tanımlama doğru olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, MALDI-TOF MS yönteminin bir başka avantajı da plak üzerinde koloniler görünür hale gelir gelmez tanımlama açısından uygun olmasıdır. Oysa ticari yöntemler için yapısal karakteristiklere ulaşılmış olgun koloniler kullanılması gerekmektedir; bu da doğal olarak tanımlama için gereken süreyi uzatmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, MS'in klinik örneklerde *Fusarium* türleri ve dermatofitler gibi bazı filamentöz mantarların tanımlanmasında kullanılabileceği gösterilmiştir. *Aspergillus* ve *Pseudallescheria/Scedosporium*; endüstri alanında daha anlamlı olan *Penicillium*, *Verticillium* ve *Trichoderma* türleri ve birçok filamentöz fungal kontaminantlar klinik laboratuvarlarda sıklıkla izole edilmektedir. Filamentöz mantarların yapısal fenotiplerinin heterojen olması tanımlama işlemlerini etkilemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda filamentöz mantarların MALDI-TOF MS zeminli tanımlama yöntemi etkinliğinin hem referans metaspektra (RMS) hem de her bir RMS'i oluşturmak için kullanılan çalışma sayısının artırılarak çoğaltılabileceği düşünülmüş ve farklı referans spektra kütüphane yapılarının etkinliğinin test edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmalar sonucunda, a) teknik olarak yapılan tekrar çalışmalarının, yani; RMS oluşturmak için bir kültürden elde edilip incelenen spotların; b) biyolojik tekrar sayılarının, yani; her bir suş için alınan farklı pasaj kültürlerinden elde edilen RMS sayılarının ve c) kütüphaneyi oluşturmak için kullanılan bir türün farklı suş sayılarının yüksek olmasının tanımlama üzerinde olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular gözönüne alınarak klinik laboratuvarlar için daha etkili bir RMS kütüphanesi oluşturulabilir. MALDI-TOF MS tanımlama sisteminin standardize hale getirilip klinikle ilişkili küf örneklerinin saptanmasında kullanımı ile bu alanda ilerlemeler kaydedilebilir; fenotipik yöntemlerle tanımlanması güç olan örneklerin daha kolay ve kesin tanımlanması sağlanabilir.

MALDI-TOF Yöntemi İle Antifungal Direncin Saptanması

MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak yapılan protein profil incelemeleri, bazı tür/ilaç kombinasyonları açısından yeni bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Maya kökenlerinin hızlı tanımlanması bazı maya kökenlerinin tahmin edilebilir direnç profillerine dayanarak ampirik antifungal tedavi seçilmesine yardımcı olabilir. Bununla birlikte, değişken duyarlılık kalıplarına sahip olan kökenler için, antifungal duyarlılık testi kesin bir sonuç elde edilebilmesi için mutlaka yapılmalıdır. Şu anda geçerli olan CLSI ve EUCAST rehberi MİK oluşturabilmek için "sıvı mikrodilüsyon yöntemi" (BMD) kullanımını önermektedir. Bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır, ancak sonuçlar, mantar üremelerinin gözlenmesine dayandığı için subjektif olabilir ve ayrıca sonuçların verilebilmesi için en az 24-72 saate gereksinim gösterebilir.

Azol ve Ekinokandin Direnci

Flukonazolün de içinde bulunduğu azol sınıfı ilaçlara direnç, hedef [11 ergosterol (ERG11) biyosentezi] değişikliği ya da dışa atım pompa mekanizması ile gerçekleşmektedir. Genel olarak çok ilaca direnç (MDR) pompa ekspresyonunda bir artış flukonazol direncine özgü olarak saptanmaktadır. Oysa *Candida* ilaç direnci (CDR) pompaları ekspresyonunda bir artış veya EGR11 hedefinde bir değişiklik geniş çapta bir dirence işaret etmektedir. Benzer şekilde ekinokandinlere direnç de bu sınıf ilaçların hedefi olan 1,3 D-glukan sentazı kodlayan genlerdeki mutasyonlarla gelişmektedir. MALDI-TOF MS yöntemi, proteinlerin spektral profillerinin incelenmesine dayandığı için, belirli proteinlerin ekspresyonundaki farklılıklar zaman zaman ham verilerin göz ile dikkatli incelenmesi, bilgisayarlı hale getirilmiş algoritmalar veya gerçek jel incelemesi ile saptanabilir. Bu yöntemin etkili olabilmesi için, protein ekspresyonundaki farklılığın dramatik olması gerekmektedir veya protein modifikasyonu durumunda, protein çok fazla olmalı ve her bir hücrede eksprese edilen "arkaplan" proteinlerinden ayırt edilebilmelidir.

Kasprofungin Direnci

Kasprofunginin artan konsantrasyonlarına karşı gelişen yanıtta MALDI-TOF MS'in *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei* ve *C.parapsilosis* protein profillerindeki farklılıkları saptamadaki başarısı değerlendirilmiş ve MALDI-TOF yöntemi ve CLSİ'nin önerdiği sıvı mikrodilüsyon -BMD yöntemleri arasında %94 uyum olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar MALDI-TOF MS'in mayaların antifungal duyarlılık testlerinde kullanımının standart sıvı mikrodilüsyon-BMD yöntemine alternatif olabileceğini düşündürmektedir. En önemli avantajları arasında sıvı mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarının değerlendirilmesindeki subjektiviteden kurtulmak ve geçerli sonuçların elde edilmesi için gereken inkübasyon süresinin en az 15 saat (15-24) azalmasıdır. Bununla birlikte, bu yöntemin etkinlik ve tekrarlanabilirliğini değerlendirebilmek için çok fazla örneği ve farklı maya türleri ile değişik antifungalleri de içeren ek çalışmalar yapılmalıdır.

Standart protokollerle kıyaslandığında MALDI protokolü, ortalama 1.45 gün daha erken tanımlama sağlamaktadır ($p < 0.001$). Antifungal duyarlılık testleri için ticari CLSİ veya EUCAST zeminli yöntemlerle kıyaslandığında, rutin laboratuvarlarda klinik kökenlerden elde edilen mikroorganizmaların tanımlanmaları için MALDI-TOF MS'in kullanıldığı laboratuvarlar için kesinlikle maliyet-etkin olduğu saptanmıştır.

Özet olarak, mantar türlerinin tanımlanması ve antifungal duyarlılık testlerinin MALDI-TOF MS zeminli teknoloji ile çalışılmasının güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir.

Kaynaklar

- Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:750-5.
- Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 2013; 13(5):788-99.
- Buchan BW, Ledebor NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1359-66.
- Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, Sebel M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv* 2014; 32:230-41.
- De Carolis E, Vella A, Florio AR, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2479-83.
- Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(2):153-8.
- Ling H, Yuan Z, Shen J, Wang Z, Xua Y. Accuracy of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2014; pii: JCM.00700-14.
- L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol*. 2013; 51:713-20.
- Normand AC, Cassagne C, Ranque S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol* 2013; 13:76.
- Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vandenberg O, Detandt M. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol* 2013; 51:580-5.
- Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics* 2013; 10:151-64.
- Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, Posteraro P, Sanguinetti M. Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6: e2014030.
- Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Methods* 2013; 94:262-6.
- Ranque S, Normand AC, Cassagne C, et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses* 2014; 57:135-40.
- Santos C, Paterson RR, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 2010; 108:375-85.
- Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, et al. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2964-9.
- Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:65-7.

TÜBERKÜLOZ TANISINDA YENİ MOLEKÜLER TESTLER

Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı, İzmir

TÜBERKÜLOZ TANISINDA BİYOBELİRTEÇLER

Doç. Dr. Zeynep SARIBAŞ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Biyobelirteçler, biyolojik süreçlerde, patolojik durumlarda veya tedaviye yanıtı belirlemede kullanılacak, objektif özelliklerdir. Biyobelirteçler, klinik örnekte ölçülebilen statik bir değer olabildiği gibi, bir süreç veya uyarının değerlendirildiği dinamik ölçümler de olabilir. Günümüzde malign, kronik inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların tanısında kullanılanlabilecek biyobelirteçler belirlenmeye çalışılmaktadır. Biyobelirteçler, hastalık tanısının yanı sıra hastalığın seyrini ve tedavi yanıtını da belirlemede kullanılabilir.

Tüberkülozda, hastalığın tanısı, aktif tüberküloz tedavisinin izlenmesi, latent tüberküloz reaktivasyonu ve aşı ile gelişen immün yanıtı belirlemek amacıyla çok sayıda çalışma yapılmakta ve biyobelirteçler tanımlanmaya çalışılmaktadır. Günümüzde tüberküloz tanısında kullanılan mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülmesi, yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir, ancak duyarlılığı yüksek değildir. Tüberküloz tanı ve tedavi takibinde kullanılmak üzere balgam, serum, idrar, nefes gibi örnekler kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmakta ve biyobelirteçler tanımlanmaya çalışılmaktadır. Biyobelirteç olarak çalışmaya alınan ve aday olabilecek başlıca moleküller, bakteriye ait ve konağın immün yanıtında etki gösteren moleküller olarak ikiye ayrılabilir (1-5).

Mycobacterium tuberculosis antijenleri öncelikle araştırılan biyobelirteç adayları olmuştur (6). *M.tuberculosis* Ag85 kompleks en çok araştırılan antijenlerden biridir. Ag85 kompleksi, 30-32 kDa ağırlığında üç proteinden oluşmaktadır. Bu kompleks, mikobakteri hücre duvarında yer alan trehaloz dimikolatın sentezinde rol oynar. Ag85 proteinleri sekrete edildiklerinden mikobakteri hücre duvarı dışında, fagozomda, kanda, balgamda bulunabilir. Yapılan çalışmalarda izoniazidin Ag85 kompleks ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. İzoniazid tedavisi verilen kişilerde, balgamda, 14. gündeki Ag85 kompleks yüksekliği 90. günden sonra görülen persistans ile ilişkilendirilmiştir (6-8).

Mpt64, *M.tuberculosis* komplekse yüksek özgüllük gösteren, *M.tuberculosis* kompleks'in erken üreme döneminde salgılanan, yaklaşık 23-24 kDa ağırlığında bir protein olup, immünojenik özelliktedir. Özellikle enfeksiyonun erken döneminde T hücre proliferasyonunu ve IFN- γ salınımını stimule etmektedir. Bu nedenle tüberküloz tanısı için deri testi çalışmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca tek olarak veya ESAT-6 antijeniyle birlikte aşı olarak da kullanılması amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Mpt64 antijeninin, anti-apoptotik etkiyle mikobakterinin makrofaj içinde persistan kalmasında etkili olduğu ileri sürülmektedir. Mpt64 antijeninin kullanıldığı deri testi

geliştirilmiştir. Yama şeklinde uygulanan bu testin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir. Deri testinin yanı sıra Mpt64 antijeni ile immünokromatografik, immünohistokimyasal, ELISA ve kantitatif gerçek zamanlı PCR'a dayalı testler geliştirilmiştir. Özellikle immünokromatografik testler *M.tuberculosis* ile tüberküloz dışı mikobakterileri ayırmada yaygın kullanım alanı bulmuştur (6,9).

Tüberküloz tanısında kullanılacak bir diğer antijen ise lipoarabinomannan (LAM)'dır. İdrarda LAM saptayan testler geliştirilmiştir. Duyarlılığı yüksek olmamakla birlikte özellikle HIV pozitif kişilerde kullanılabilir (6,10).

Tüberküloz tanısı için konağın immün yanıtına bağlı biyobelirteçler de araştırılmaktadır. Özellikle aktif ve latent tüberküloz ayırımında kullanılacak biyobelirteçler tanımlanmaya çalışılmaktadır. IFN- γ salınım testleriyle (IGST), *M.tuberculosis* enfeksiyonu saptanabilmekte, ancak aktif ve latent tüberküloz ayırımı yapılamamaktadır. IP-10, IFN- γ 'ya alternatif olabilecek en önemli biyobelirteç adaylarından biridir. IP-10 başlıca aktive antijen sunucu hücreler tarafından eksprese edilen bir kemokindir. IFN- γ 'dan daha yüksek düzeyde sekrete edilmesi nedeniyle küçük hacimdeki örnekler yeterli olabilmektedir. IP-10'un tam kan örneklerinde stabil kalması, bu kemokinin hasta başı testi geliştirme çalışmalarında da kullanılmasını sağlamıştır (11-13). IP-10'nin yanı sıra IL-4, IL-4 δ 2, TNF- α , MCP-1, MCP-2, MIG, IL-15, IL-17 vb. sitokinlerin özellikle latent ve aktif tüberküloz ayırımında biyobelirteç olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (11,14).

Son yıllarda, tüberküloz biyobelirteci olarak mikroRNA (miRNA)'lar çalışmaya başlanmıştır. miRNA'lar, endojen, kodlamayan, 19-22 nükleotid uzunluğunda RNA'lardır. Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunda görev alarak, hücre metabolizması, proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıtı düzenlerler. Virülan olan ve olmayan mikobakteri türleri hücre duvarı bileşenlerinin, makrofajlarda farklı miRNA'ların ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Aktif ve latent tüberküloz hastalarının periferik kan mononükleer hücre örneklerinde miRNA 223'ün ekspresyonu araştırılmış ve aktif tüberkülozlu hastalarda bu miRNA'nın daha yüksek düzeyde eksprese olduğu saptanmıştır (15-19).

Tüberküloz tanısı, özellikle de latent ve aktif tüberküloz ayırımında kullanılacak pek çok biyobelirteç adayı çalışılmaktadır. Birden fazla biyobelirtecin birlikte kullanımını tanıda ve latent tüberkülozdan aktif tüberküloza geçişi belirlemede yararlı olabilir. Tüberküloza karşı gelişen immün yanıt bugün genel olarak açıklığa kavuşturulmuş olsa da, daha ayrıntılı çalışmalarla yeni belirlenecek im-

mün biyobelirteçler, hasta başı testlerin geliştirilmesine ve dolayısıyla tüberküloz tanısının kolay ve kısa sürede konmasını sağlayacaktır (1-5).

Kaynaklar

1. Wallis RS, Doherty TM, Onyebujoh P, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 162-72.
2. Wallis RS, Pai M, Menzies D, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *Lancet* 2010; 375: 1920-37.
3. Maertzdorf J, Weiner J 3rd, Kaufmann SH. Enabling biomarkers for tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16: 1140-8.
4. Wallis RS, Kim P, Cole S, et al. Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 362-72.
5. Weiner J 3rd, Maertzdorf J, Kaufmann SH. The dual role of biomarkers for understanding basic principles and devising novel intervention strategies in tuberculosis. *Ann NY Acad Sci* 2013; 1283: 22-9.
6. Bermurzayeva A, Sypabekova M, Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2013; 93: 381-8.
7. Wallis RS, Perkins M, Phillips M, et al. Induction of the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum: a determinant of outcome in pulmonary tuberculosis treatment. *J Infect Dis* 1998; 178: 1115-21.
8. Wallis RS, Phillips M, Johnson JL, et al. Inhibition of isoniazid-induced expression of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 in sputum: potential surrogate marker in tuberculosis chemotherapy trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1302-4.
9. Yin X, Zheng L, Lin L, et al. Commercial MPT64-based tests for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a meta-analysis. *J Infect* 2013; 67: 369-77.
10. Flores LL, Steingart KR, Dendukuri N, et al. Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 1616-27.
11. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:343-54.
12. Chegou NN, Heyckendorf J, Walzl G, Lange C, Ruhwald M. Beyond the IFN- γ horizon: biomarkers for immunodiagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. 2014; 43: 1472-86.
13. Ruhwald M, Aabye MG, Ravn P. IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions. *Expert Rev Mol Diagn* 2012; 12: 175-87.
14. Frahm M, Goswami ND, Owzar K, et al. Discriminating between latent and active tuberculosis with multiple biomarker responses. *Tuberculosis* 2011; 91: 250-6.
15. Singh PK, Singh AV, Chauhan DS. Current understanding on microRNAs and its regulation in response to mycobacterial infections. *J Biomed Sci* 2013; 20:14.
16. Harapan H, Fitra F, Ichsan I, et al. The roles of microRNAs on tuberculosis infection: meaning or myth? *Tuberculosis* 2013; 93: 596-605.
17. Dorhoi A, Iannaccone M, Maertzdorf J, Nouailles G, Weiner J 3rd, Kaufmann SH. Reverse translation in tuberculosis: Neutrophils provide clues for understanding development of active disease. *Front Immunol* 2014; 5: 36.
18. Iannaccone M, Dorhoi A, Kaufmann SH. Host-directed therapy of tuberculosis: what is in it for microRNA? *Expert Opin Ther Targets* 2014; 18: 491-4.
19. Miotto P, Mwangoka G, Valente IC, et al. miRNA signatures in sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One* 2013; 8: e80149.

İKİNCİ SIRA İLAÇ DİRENCİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Doç. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

Tüberküloz (TB) tedavisinde en önemli birinci sıra ajanlardan izoniazid ve rifampisine direnç durumu olarak tanımlanan çok ilaca dirençli TB (ÇİD-TB), küresel TB kontrolü için ciddi bir tehdittir. Son zamanlarda, ÇİD-TB'ye ek olarak en önemli ikinci sıra ilaçlardan florokinolonlar ile amikasin, kanamisin ve kapreomisin'den en az birine direnç olarak tanımlanan, yaygın ilaca dirençli TB (YİD-TB) son derece kötü tedavi sonuçları nedeniyle küresel TB kontrolü ile ilgili endişelerin daha da artmasına neden olmuştur. Her yıl dünyada yaklaşık 500.000 ÇİD-TB olgusu görülmekte ve bunların %5-10'u YİD-TB olgularından oluşmaktadır. Sonuç olarak, ikinci sıra anti-TB ilaçların duyarlılık testlerinin önemi giderek artmaktadır.

Tüberküloz ve TB'da ilaç direncinin erken ve doğru tanısı, hastalığın kontrolünde küresel bir önceliktir. Bu nedenle her hasta için kültürde izole edilen ilk *M.tuberculosis* izolatına birinci sıra ilaç duyarlılık testi (İDT) uygulanmasının gerektiği kabul edilmektedir. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), son klavuzunda klinisyenlere ilaç tedavisine ilişkin kapsamlı bilgi sunulmasını sağlamak için, başlangıçta birinci sıra ilaçların tümünün [izoniazid (INH), rifampisin (RMP) etambutol (EMB) ve pirazinamid (PZA)] test edilmesini önermektedir.

Mycobacterium tuberculosis izolatı RIF'e veya birinci sıra ilaçların herhangi ikisine dirençli olarak saptanırsa izolatın ikinci sıra ilaçlara duyarlılığı test edilmelidir. Sadece INH'a direnç saptanmış, fakat klinisyen tedavi rejimine bir ikinci sıra ilaç (örn. florokinolon) eklemeyi planlıyorsa yine ikinci sıra ajanlar test edilmelidir. Ayrıca hızlı, ticari bir kültür sistemi ile direnç saptanmış ve sonucun doğrulanması için test tekrarı planlanıyorsa da zaman kazanmak için ikinci sıra ilaçlar eşzamanlı test edilmelidir. Benzer şekilde moleküler bir yöntem ile ÇİD-TB ilişkili mutasyon saptandığında, fenotipik yöntem ile sonucun doğrulanması için test tekrarı yapılırken, ikinci sıra ilaçlar da eşzamanlı test edilmelidir.

İkinci sıra İDT endike olduğunda, en az bir florokinolon ve enjektabl ilaçlardan amikasin, kanamisin ve kapreomisin test edilmelidir. Test edilecek florokinolon, tedavide en çok kullanılan ilaç olmalıdır. Duyarlılık test sonuçlarında amikasin, kanamisin ve kapreomisin arasında çapraz direnç her zaman görülmediğinden bu ajanların tümünün test edilmesi önerilmektedir.

Birinci sıra ilaçlar için önerilen fenotipik duyarlılık testleri, test edilmesi önerilen florokinolonlar ve parenteral ilaçlar için de güvenilir sonuçlar vermektedir. Ancak bu yöntemler diğer ikinci sıra ilaçlar için yeterince standardize edilmemiştir. Hızlı ticari kültür sistemleri

kullanılsa bile, kültür izolatlarından çalışılması önerilen fenotipik yöntemler geç sonuç vermektedir. Birinci sıra İDT sonuçlarına göre ikinci sıra İDT endikasyonunun belirlendiği basamaklı uygulamada, ikinci sıra ilaçlar için sonuçlar daha da geç alınmaktadır. Genel olarak ikinci sıra İDT'ler birinci sıra İDT'ler kadar kolay değildir. Ayrıca ticari kültür sistemlerinde genellikle ikinci sıra ilaçlar için hazır ticari test kitleri bulunmadığından, seyrek olarak ikinci sıra İDT yapması gereken ve yeterli deneyimi olmayan laboratuvarların, bu testler için izolatı referans bir laboratuvara göndermeleri önerilmekte, bu durum sonuçların alınmasını daha da geciktirebilmektedir.

Moleküler çalışmalardaki ilerlemeler, mikobakterilerdeki ilaç direncinin ana mekanizmaları ile ilgili bilgilerimizi de artırmıştır. Bu bilgiler, ilaç direncinin hızlı saptanması için yeni tekniklerin geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. Mikobakterilerde kazanılmış ilaç direncinin ana nedeni kromozomal gendeki spontan mutasyonlardır. İkinci sıra ilaçlardan florokinolonlar, DNA girazı inhibe ederek etki etmektedirler. Florokinolonlara direnç, sıklıkla DNA girazın A ünitesini kodlayan *gyrA* geninde "kinolon direncini belirleyen bölge" (quinolone resistance-determining-region, QRDR)'deki mutasyonlar sonucunda gelişmektedir. Daha seyrek olarak *gyrB* genindeki mutasyonlar da florokinolonlara direnç ile ilişkili olabilmektedir. Kanamisin, amikasin ve kapreomisin için en yaygın direnç mekanizması 16S RNA kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlardır. Daha seyrek olarak, aminoglikozid asetiltransferazı kodlayan *eis* geni promotör bölgesindeki mutasyonlar da aminoglikozid direncinden sorumlu olabilmektedir. Kapreomisin direncinde 2'-O-metilasyonu için özgül rRNA metiltransferazı kodlayan *tlyA* genindeki mutasyonlar da rol oynayabilmektedir.

M.tuberculosis'in ilaç direncinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler ilaç direnci ile ilişkili mutasyonların saptanmasına yöneliktir. Moleküler yöntemlerin çok hızlı sonuç vermeleri ve laboratuvar güvenliği açısından daha az risk oluşturmaları gibi önemli avantajları vardır. Moleküler bir yöntemle direkt klinik örnekten ilaç direncini göstermek 1-2 günde mümkün olabilmektedir. *M.tuberculosis*'in ikinci sıra ilaçlara direncini belirlemede kullanılan başlıca moleküler yöntemler arasında; DNA dizi analizi, ters hibridizasyon testleri (Line prob assay; LPA) ve DNA *mikroarray* sayılabilir.

DNA dizi analizi, ilaç direnci ile ilişkili mutasyonların saptanmasında referans moleküler yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak bu teknoloji (klasik Sanger yöntemi), oldukça zahmetli ve rutin uygulamada kullanım için tam olarak standardize değildir. Pirosekanslama, kısa genomik

DNA segmentlerinin dizi analizinde kullanılan, yarı-otomatik, gerçek zamanlı, alternatif bir DNA dizi analizi yöntemidir. Yöntem biotin işaretli primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan dirençle ilişkili genlerin uzayan zincirine komplementer nükleotid eklenmesi ile tetiklenen kimyasal ışık oluşması temeline dayanır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, klinik örneklerde ve izolatlarda dirençle ilişkili mutasyonların saptanmasında, bir iş gününde başarılı sonuçlar veren bu yöntemin, tanıl ve halk sağlığı laboratuvarlarında kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak kapsamlı ekipman gerektirmesi rutin kullanımını kısıtlamaktadır. Bilinmeyen veya yeni mutasyonları saptamada ya da fenotipik ve genotipik tabanlı sonuçlar arasındaki uyumsuzluklarda DNA dizi analizi yönteminin kullanılması uygun olabilir.

Ticari moleküler testlerin çoğu, birinci sıra ilaçların direncini saptamaya yönelik testlerdir. İkinci sıra ilaç direncini saptamaya yönelik olarak 2009'da piyasaya sürülen ticari bir LPA olan GenoType MTBDR_{sl} (Hain Lifescience, Germany) günümüzde bu amaçla rutin uygulamada en yaygın kullanılan moleküler testtir. GenoType MTBDR_{sl}, hem klinik örnekte hem de izolatta, *gyrA*, *rrs* ve *embB* genlerindeki mutasyonları saptayarak, florokinolon, kanamisin, amikasin, kapreomisin, ethambutol ve streptomisin direncini hızlı olarak gösterebilmektedir. Test prosedürü; a) mikobakteriyel DNA'nın ekstraksiyonu, b) dirençle ilişkili belirli gen bölgelerinin biotin eklenmiş primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyonu ve c) PCR ürününün özgül oligonükleotid prob immobilize edilmiş bir strip üzerine ters hibridizasyonu olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır. Hibridizasyon sonrası alkalin fosfatazla işaretlenmiş streptavidin ilavesi ile renk değişimi sonucu oluşan bant paternleri görsel olarak değerlendirilir.

DSÖ tarafından, 2013 yılında yayınlanan uzman grubu toplantı raporunda, GenoType MTBDR_{sl} testi ile ilgili yayınlar analiz edilmiştir. Bu raporda GenoType MTBDR_{sl} testinin florokinolon ve ikinci sıra enjektabl ilaçlara direncin saptanmasında yüksek özgüllük gösterdiği, ancak duyarlılığının yüksek olmaması nedeniyle negatif sonuçların direnci güvenilir şekilde ekarte edemeyeceği sonucuna varılmıştır. Uzman grubu, testin geleneksel fenotipik ilaç duyarlılık testi yerine kullanılmayacağını, daha fazla veri elde edilinceye kadar, fenotipik testlerin YİD-TB tanısı için referans standart kalması gerektiğini belirtmiştir. Bu raporda alınan karara göre; (1) GenoType MTBDR_{sl}, YİD-TB için bir tarama testi (ekarte etmek için değil) olarak kullanılabilir, ancak sürveyans amaçlı YİD-TB'yi tanımlamak için kullanılamaz, (2) ikinci sıra enjektabl ilaçlar arasında her zaman çapraz direnç olmadığı için, bu test tedavi için kullanılacak olan ilacı belirlemek için kullanılamaz, (3) geleneksel fenotipik testlerden doğrulayıcı sonuçlar beklenirken enfeksiyon kontrol önlemlerine yol göstermesi için bu test kullanılabilir.

DNA *mikroarray* testleri de ticari olarak umut vadeden moleküler testlerdir. Son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada *gyrA*, *rrs* ve *eis* gen bölgelerindeki mutasyonu saptayarak florokinolon ve enjektabl ikinci sıra ilaçlara

direnci saptamak için tasarlanmış bir *mikroarray* testi değerlendirilmiş ve testin PCR deneyimi olan herhangi bir klinik laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilecek, güvenilir bir test olduğu iddia edilmiştir. Ancak bu teknolojinin henüz olduğu iddia edilmiştir. Ancak bu teknolojinin henüz olduğu iddia edilmiştir. Ancak bu teknolojinin henüz olduğu iddia edilmiştir. Ancak bu teknolojinin henüz olduğu iddia edilmiştir.

İkinci sıra ilaçlara direnci belirlemede gerçek-zamanlı PCR yöntemleri de geliştirilme aşamasındadır. Çalışmalar, yakın gelecekte bu yöntemlerin ticari olarak piyasaya sürüldüğünde, RIF direncini saptamaya yönelik olan Xpert MTB/RIF testi (Cepheid, USA) gibi ikinci sıra ilaçlara direncin erken saptanmasında oldukça yararlı ve kolay testler olacağını düşündürmektedir.

İlaç direncinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemlerde en önemli kısıtlılık, hedef bölgedeki mutasyonların fenotipik direncin ne kadarından sorumlu olduğudur. Özellikle ikinci sıra ilaç direnci için elde edilen sonuçlar, moleküler testlerin duyarlılığının %100'e ulaşmasının zor olacağını göstermektedir. Bu durum, bilinen moleküler testlerin hiç birinin, dirençte rol oynaması muhtemel tüm genleri veya mekanizmaları (bazıları henüz tanımlanmamış olan) hedeflememesinden ve dolayısıyla ilaç direncine yol açan, bilinmeyen mutasyonları saptayamamasından kaynaklanmaktadır. Üstelik tüm tanımlanmış genetik değişikliklerin, direnç ile ilişkili bir mutasyon mu, yoksa sadece bir polimorfizm mi olduğu da henüz açıklık kazanmış değildir. Sessiz mutasyonlar yanlış direnç sonuçlarına neden olabilir. Suş topluluğundaki mutasyonların sıklığı da bölgeye göre değişebilir. Moleküler bir test belirli bir yerde uygulanmadan önce, farklı coğrafi bölgelerde direnç mutasyonlarını tespit etmek için güvenilirliği kanıtlanmış olmalıdır. Moleküler testlerin diğer bir doğal kısıtlılığı, dirençli ve duyarlı suşların bir karışımı olarak tanımlanan heterorezistansın güvenilir olarak saptanamamasıdır. Vahşi tip ve mutant DNA karışımı içinde mutant DNA'nın saptanma limiti yaklaşık %10'dur. Bir izolattaki dirençli hücrelerin oranı bu miktardan daha az ise moleküler yöntemlerle zor tespit edilecektir, oysa ki klasik duyarlılık testi bu gibi durumlarda daha duyarlı bir test sonucu verebilir.

LPA'lar ile ilgili olarak, diğer bir kısıtlılık, tek bir test ile sınırlı sayıda mutasyonun saptanabilir olmasıdır. LPA'lar sadece dirence en sık yol açan mutasyonların saptanmasını sağlamaktadır. Hedeflenen bölge dışında mutasyonlar olduğunda, vahşi tip bant paternleri görüntülenir ve bu durum yanlış duyarlı sonuçlara yol açacaktır. Mutasyonlar vahşi tip bantlarındaki eksiklik ile gösterildiğinde ise, özgül mutasyon bilgisi eksik kalacaktır. Moleküler yöntemlerin dezavantajları arasında maliyet, ileri altyapı ve deneyimli personel gereksinimi de sayılabilir.

Sonuç olarak, günümüzde değil fakat belki de gelecekte, mikobakterilerdeki ilaç direncinin moleküler mekanizmaları ile ilgili bilgilerimiz arttıkça ve moleküler tanı teknolojileri geliştikçe, direkt klinik örnekten hem *M.tuberculosis*'in hem de birinci ve ikinci sıra ilaç direncinin eşzamanlı, bir günde saptanması mümkün olabilecektir.

Kaynaklar

- Abebe G, Paasch F, Apers L, Rigouts L, Colebunders R. Tuberculosis drug resistance testing by molecular methods: opportunities and challenges in resource limited settings. *J Microbiol Methods* 2011; 4:155-60.
- Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1417-30.
- Campbell P J, Morlock G P, Sikes RD, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:2032-41.
- Chakravorty S, Aladegbami B, Thoms K, et al. Rapid detection of fluoroquinolone-resistant and heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of sloppy molecular beacons and dual melting-temperature codes in a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2011; 49:932-40.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic Actinomycetes. Approved Standard, 2011, 2nd ed. CLSI Document M24-A2. Pennsylvania.
- Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Bang D, Papaventsis D. Diagnosis of tuberculosis and drug resistance: what can new tools bring us? *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:860-70.
- Lacoma A, García-Sierra N, Prat C, et al. GenoType MTBDRsl for molecular detection of second-line-drug and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *J Clin Microbiol* 2012; 50:30-6.
- Lange C, Abubakar I, Alffenaar JW, et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2014 [Epub ahead of print]
- Lin SY, Rodwell TC, Victor TC, et al. Pyrosequencing for rapid detection of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical isolates and clinical specimens. *Clin Microbiol* 2012;52:475-82.
- Pholwat S, Stroup S, Foongladda S, Houpt E. Digital PCR to detect and quantify heteroresistance in drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2013;8: e57238.
- Richter E, Rüsç-Gerdes S, Hillemann D. Drug-susceptibility testing in TB: current status and future prospects. *Expert Rev Resp Med* 2009; 3:497-510.
- Theron G, Peter J, Barnard M, et al. The GenoType® MTBDRsl test for resistance to second-line anti-tuberculosis drugs (Protocol). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 8. Art. No.: CD010705. DOI: 10.1002/14651858.CD010705.
- World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): policy statement. 2008, WHO, Geneva.
- World Health Organization. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. 2008, WHO, Geneva. WHO/HTM/TB 2008.392.
- World Health Organization. The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. 2013, WHO, Geneva. WHO/HTM/TB 2013.01.
- Zimenkov DV, Antonova OV, Kuz'min AV, et al. Detection of second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using oligonucleotide microarrays. *BMC Infect Dis* 2013; 13:240.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PEKİN GENOTİPİNİN TÜRKİYE'DE YAYGINLIĞI

Doç. Dr. Orhan Kaya KÖKSALAN

İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul

M.tuberculosis klonal yayılımını genel olarak altı ana soydan gelmekte ve her soy belirli coğrafik kısıtlamalar göstermektedir. Her soy, kendi coğrafyasında bulunan insan popülasyonlarını daha kolay hasta edebilmekte (simpatrik popülasyon), diğer coğrafyalardaki insan popülasyonlarını (allopatrik popülasyon) daha güç hastalandırabilmektedir. Her *M.tuberculosis* soyunun allopatrik popülasyonlarda hastalık oluşturabilmesi, büyük oranda göçler vasıtasıyla olabilmektedir. Ancak göçler de tek başına yeterli değildir; popülasyonların kaynaşması ve yakın ilişki içine girmesi gerekmektedir (demic diffusion).

Pekin genotipi Çin'den orijin almakla beraber, tarih boyunca süren göçlerle Rusya'ya ve başka bölgelere sıçramıştır. Pekin genotipine ait suşların ülkemize Rusya ve eski Sovyetler Birliği ülkelerinden geldiğinin en iyi kanıtları epidemiyolojik taramalar ve saptanan suşların M2 ve B0/W148 alt gruplarına ait olduğunun belirlenmiş olmasıdır.

Ülkemizde ilk kez 2002-2005 döneminde Pekin genotipine ait suşlar %1.1 oranında görülmüştür. Bu dönem içinde, laboratuvarımızda elde edilen MDR (*multidrug-resistant*) suşları arasında görülme sıklığı %5-6 arasında bulunmuştur. Bugün ise bu oran %30 civarındadır. Bu suşların yarısına yakını yabancı hastalardan (Azeri, Kırgız, Özbek, vb) izole edilmiştir.

İleriye baktığımızda, dirençle ilişkili bir soy olan Pekin genotipinin ülkemizde yayılıp yayılmayacağı kaygı uyandırıcıdır.

Kaynaklar

- Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)* 2011; 91(6):510-23.
- Kisa O, Albay A, Baylan O, Tozkoparan E, Acikel CH, Doganci L. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates at the Military Medical Academy in Ankara, Turkey. *Res Microbiol* 2007; 158(4):318-23.
- Kisa O, Tarhan G, Gunal S, et al. Distribution of spoligotyping defined genotypic lineages among drug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates in Ankara, Turkey. *PLoS One* 2012; 7(1):e30331.
- Koksalan OK, Kilicaslan Z, Zanlier G, Guzel R, Seber E. Prevalence of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis strains in Istanbul. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(4):469-72.
- Koksalan OK. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit locus 26 for rapid identification of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis strains. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4):1612.
- Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(2):342-60.
- Oral Zeytinli U, Köksal F. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in Cukurova Region, Turkey by spoligotyping and MIRU-VNTR methods. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(2):202-10.
- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis* 2010; 10(2):103-11.

MOLEKÜLER TANI RUTİN VETERİNER MİKROBİYOLOJİDE NELERİ DEĞİŞTİRDİ?

Prof. Dr. Kadir Serdar DİKER

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliştirilen tüm kontrol ve mücadele yöntemlerine ve araçlarına rağmen, enfeksiyöz hastalıklar halen hayvan sağlığını tehdit eden en yaygın ve önemli hastalık grubunu oluşturmaktadır. Enfeksiyöz hastalıkların bu önemi, neden oldukları ölümler ve ekonomik kayıptan kaynaklanmaktadır. Ayrıca enfeksiyonların çoğunun zoonotik karakter taşıması nedeniyle insan sağlığı için oluşturduğu risk, konunun diğer önemli bir boyutunu oluşturmaktadır. Bu yüzden, hayvan enfeksiyonları ile doğru ve etkili bir şekilde savaşabilmek için, öncelikle bunları doğru ve hızlı olarak teşhis edilebilmek gerekmektedir.

Klasik/Konvansiyonel Yöntemlere Alternatif Yöntemler Neden Gerekli?

Enfeksiyonların laboratuvar tanısında bakteriyolojik ve serolojik tabanlı klasik yöntemler halen kullanılmaktadır. Bu yöntemleri ve alternatiflerini sorgularken göz önünde tutulması gereken çeşitli unsurlar vardır. Bunlar, doğruluk-geçerlilik, süre, zorluk, kapasite, iş gücü ve maliyet olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, bu yöntemleri irdelerken, her bir enfeksiyon veya mikroorganizma grubu için ayrı değerlendirme yapmak gerektiği açıktır. Klasik yöntemler bazı enfeksiyonların tanısında halen geçerliliğini korurken, bazılarında yetersiz kalmaktadır. Örneğin, anaeroblar, spiroketler, riketsiyalar, klamidya-lar, mikoplazmalar ve mikobakterilerin bakteriyolojik tanısı her zaman sorunlu olmuştur. Bu mikroorganizmaların özel üreme ortamı ve koşullarına gereksinim göstermesi ve neredeyse her biri için ayrı uzmanlık veya deneyim gerekmesi ilk ve en önemli sorunu oluşturmaktadır. Üreme ortamlarının hazır tutulması, özel üreme koşullarının sağlanması için yapılan harcamalar, yoğun iş gücü ve kapasite kullanımı klasik yöntemlerin maliyetini ciddi düzeyde artırmaktadır. Tüm bu unsurlar karşılanırsa bile, klasik tanı yöntemlerinin doğruluğu veya geçerliliği tartışmaya açık olmaktadır. Çünkü, tanı materyalinin alındığı anda, mikroorganizmanın vücuttaki dağılımı, klinik örnekteki bakteri sayısı ve canlılığı gibi her bir enfeksiyona özel durumlar, özellikle negatif tanı sonucunu sorgulamaya açık hale getirmektedir. Tüm bunlara ek olarak, bakteriyolojik tanı için gereken sürenin uzunluğu, özellikle kritik veya acil durumlarda olumsuz diğer bir unsurdur; çünkü konvansiyonel yöntemlerle tanımlamada, doğru sonuç uzun süre ile doğru orantılıdır. Sonuç olarak, mikrobiyal tanının her aşamasında, konvansiyonel tanı yöntemlerinin açıklarının kapatılması ve desteklenmesi için alternatif tanı yöntemlerine gerek olduğu görülmektedir.

Klasik/Konvansiyonel Yöntemlere Karşı Moleküler Tanı Yöntemleri

Moleküler biyoloji ve mühendislik alanındaki teknolojik gelişmeler, 10 yıl önce hayal bile edilemeyecek yöntemlerin kullanılmasına olanak sağlamıştır. Başta araştırmalar olmak üzere mikrobiyolojinin her alanında yer bulan bu yöntemlerin en büyük fırsat sunduğu alan ise moleküler tanıdır. Son yıllarda tanı amaçlı kullanılacak çok sayıda moleküler yöntem geliştirilmiştir ve bunların konvansiyonel yöntemlerin olumsuz yönlerine alternatif olabilecek özellikleri vardır. Özellikle güç üreyen veya özel ortam gerektiren mikroorganizmalar, çoğu genel olan sarflar ve basit cihazlar kullanılarak saptanabilir. Küçük hacimlerde ve seri olarak gerçekleştirilen reaksiyonlar az iş gücü gerektirir ve test başı maliyeti düşüktür; dolayısıyla gerekli kontrol ve temel sarflara sahip tüm laboratuvarlar tanıyı gerçekleştirebilir. Her enfeksiyonun kendine has özelliklerine bağlı olmak koşuluyla, moleküler tanı genellikle daha az sayıda mikroorganizmayı, hatta cansız olanları, daha çok klinik örnekte, hatta kontamine olanlarda saptayabilir. Tüm bunların yanında klasik tanının en önemli eksikliği olan süre, moleküler tanının en güçlü yönüdür; enfeksiyon tipine bağlı olarak sürede onlarca kat avantaj sağlayabilir. Yukarıdaki değerlendirmelerin tümünün konvansiyonel yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlar için yapıldığı unutulmamalıdır. Örneğin; sütte stafilkok tanısı için yapılan kültüre veya kanda antraks tanısı için yapılan boyamaya alternatif aramak gereksizdir. Böyle durumlarda moleküler tanı ancak özel amaçlar için bir alternatif olabilir.

Moleküler Tanı Yöntemlerinin Veteriner Mikrobiyolojiye Kazandırdıkları

Veteriner mikrobiyolojinin önemli özelliklerinden birisi tıbbi mikrobiyolojiye göre daha fazla sayıda mikroorganizma ile uğraşmasıdır. Çünkü insanı bir tür olarak değerlendirecek olursak, tüm hayvanlar çok sayıda tür demektir. Çoğu birim içi geliştirilen veya optimize edilen moleküler tanı yöntemleri ile elde edilen kazanımlar ve örnekler aşağıda sıralanmıştır.

- Klasik tanı listesinde olmayan enfeksiyonlar moleküler tanı listesine girmiştir. Örneğin; pahalı besiyeri gerektiği için leptospiralar ve mikoplazmalar, özel sistem gerektiği için anaeroblar, doku kültürü gerektiği için klamidya ve riketsiyalar tanı listesinde yer almazken, moleküler tanı sayesinde rutin tanı listesine girmişlerdir.
- Daha hassas ve kesin tanı gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları ve kontrollü saha testleri, saptama

limitinin konvansiyonel kültürden daha düşük olduğunu göstermiştir. İzole edilen bakterilerin tür ve suş ayırımı fenotipik yöntemlere göre çok daha kesin olmuştur.

- c. Kontamine örneklerden tanı gerçekleştirilebilmiştir. Selektif besiyeri ile bile güçlük yaşanan kokuşmuş nekropsi örnekleri, dışkı, gübre, altlık, atık su ve toprak gibi kontamine veya çok karışık floraya sahip materyallerde özgül etkenlerin aranması mümkün hale gelmiştir.
- d. Gereken iş gücü ve tanı maliyeti azalmış, laboratuvar kapasitesi artmıştır. Klasik yöntemlerde besiyeri ve test ayıraçlarının hazırlanması, malzemenin sterilizasyonu, izolasyon ve tanımlama için gereken yoğun iş gücü, moleküler yöntem ile azaltılarak bir birim iş gücü ile daha çok sayıda örnek incelenmiştir. Tüm girdiler ve israf edilen malzemeler göz önüne alındığında örnek başına maliyet klasik yöntemlere göre düşürülmüştür.
- e. Tanı süresi kısaltılmıştır. Enfeksiyonun özelliğine göre klasik yöntemle ve düşük doğruluk oranı ile en erken 48 saatte gerçekleştirilebilen tanı, yüksek doğruluk oranı ile birkaç saatte gerçekleştirilebilir hale gelmiştir.
- f. Daha kesin tür ayırımı ve tiplendirme mümkün olmuştur. Tür ayırımı %100 doğrulukla yapılabilmektedir. Amaca göre yapılan tiplendirme ile birçok olguda kaynak takibi mümkün olmuş ve bu sayede epidemiyolojik analiz yapılabilmektedir.
- g. Tıbbi atık miktarı azaltılmıştır. Konvansiyonel yöntemlerde kullanılan besiyerleri, toksik kimyasallar ve boya maddelerinin sarfi, dolayısıyla atık miktarı azaltılmıştır.
- h. Enfeksiyonlar ve olgular hakkındaki bilgiler artmıştır. Tüm etkenlerin yüksek doğruluk oranı ile saptanabilir hale gelmesi, bazı enfeksiyonlar hakkındaki klasik bilgilerin değişmesine veya yeni bilgiler eklenmesine neden olmuştur.

Hangi Moleküler Yöntemler: Uygulama Yolları ve Örnekleri

Veteriner mikrobiyolojide moleküler tanı yöntemlerinden yararlanmanın başlıca iki yolu vardır. Bunlardan birisi, moleküler tanının belirli aşamalarında veya tümünde ticari kitlerden yararlanmak, diğeri ise lokal koşulları göz önüne alarak *in-house* yöntemler geliştirip kullanmaktır. Ankara Veteriner Mikrobiyoloji bölümü olarak tercih edilen daha çok ikinci yoldur. Çünkü, Türkiye koşullarında görülen hayvan hastalıklarının spektrumu genelde kitlerin geliştirildiği ülkelerden geniş ve bazen farklıdır. Ayrıca geçmiş deneyimler, belli hastalık grupları için ticari olarak mevcut olmayan test içerikleri kullanılması gerektiğini göstermiştir. Örneğin; sığır-koyun abortlarında kullanılan 3x3 multipleks PCR kiti, Türkiye'de en sık görülen abortus etkenlerinin saptanması için özel olarak optimize edilmiştir ve dünyada başka örneği yoktur. Adı geçen birimde en sık kullanılan moleküler tanı yöntemleri ve bunun optimizasyonu için izlenen yollar aşağıda belirtilmiştir.

1. DNA konsantrasyonu ve ekstraksiyonu: Laboratuvarında moleküler tanı öncesi en çok önem verilen işlemdir. Farklı klinik materyallerde mikroorganizmayı veya

DNA'sını konsantre etmek için *in-house* olarak geliştirilen, filtrasyon, santrifüj ve/veya manyetik zenginleştirme aşamalarını içeren yöntemler kullanılmaktadır. Bu aşamalar sırasında ticari kitlerden de yararlanılmaktadır.

2. Tekli veya çoklu PCR: En sık görülen enfeksiyonlar için klinik materyalden direkt tanı veya izolatların konfirmasyonu için laboratuvarında geliştirilen PCR kitleri kullanılmaktadır. Bu kitlerin tanı spektrumu gereksinime göre tasarlanmaktadır.
3. Tekli veya çoklu gerçek zamanlı (real-time) PCR: Konvansiyonel PCR ile aynı amaçla kullanılmakta ve tasarlanmaktadır. Bu yöntem daha fazla sayıda örneğin incelendiği durumlarda ve kültürü yapılmış bakterilerde uygulanmaktadır.
4. DNA sekans analizi: Bakterilerin tanımlanması veya toksin üretimi gibi kritik özelliklerinin saptanması için kullanılmaktadır. Tanımlamada daha çok 16S rDNA sekansından yararlanılmaktadır.
5. Direkt 16S rDNA analizi: Bu yöntem tek tip mikroorganizma içerdiği düşünülen klinik örneklerde direkt olarak 16S rRNA genlerine yönelik PCR ve sekans aşamalarından oluşmaktadır. Bu yöntem ile çok kısa sürede çok olumlu sonuçlar alınmaktadır. Aynı yöntemin, karışık mikroorganizma içeren örneklerde uygulamasına yönelik araştırmalar halen devam etmektedir.
6. Erime eğrisi (Melting curve) analizi: Belirli hastalık gruplarında, örneğin atların solunum sistemi enfeksiyonlarında 8-10 adet mikroorganizmayı saptamak veya ayırt etmek için *in-house* geliştirilen RT-PCR tabanlı yöntem kullanılmaktadır.
7. Ribotiplendirme: İzole edilmiş bakterilerin tanımlanması için bakterinin rRNA operonunu inceleyen ticari bir sistem kullanılmaktadır. Bu sistemle %99 tür ayırımı yanında, epidemiyolojik amaçlı tiplendirme ve kaynak takibi yapılabilmektedir.
8. Diğer teknikler: Bazı bakteri gruplarının ve kanatlı virüslerinin analizi için RFLP vb tabanlı tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır.

Sonuç olarak moleküler yöntemler, iyi tasarlandıkları, optimize edildikleri ve uygulandıkları takdirde veteriner mikrobiyolojide rutin tanıya önemli katkılar yapacak ve klasik yöntemleri destekleyeceklerdir.

Kaynaklar

- Cai HY, Archambault M, Gyles CL, Prescott JF. Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim Health Res Rev* 2003; 4:73-93.
- Cai HY, Caswell JL, Prescott JF. Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective. *Vet Pathol* 2014; 51:341-50.
- Diker KS, Esendal OM, Akan M. Epidemiology of ovine *Campylobacter* infection determined by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47:739-43.
- Hoffmann B, Beer M, Reid SM, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet Microbiol* 2009; 139:1-23.
- Zadoks RN, Schukken YH. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2006; 22:229-61.

MOLEKÜLER YÖNTEMLER TÜRKİYE'DE KANATLILARDA *SALMONELLA* KONTROLÜNE NASIL KATKI SAĞLIYOR?

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Veteriner Hekimlikte *Salmonella* enfeksiyonlarının önemi son yıllarda artmaktadır. Bu önem artışı özellikle insanlardaki gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonlarındaki artışa paraleldir. Gelişmiş ülkelerde zoonotik enfeksiyonların kontrolü, gıda güvenliği kapsamında değerlendirilmekte ve özellikle enterik patojenlerin epidemiyolojileri ve hayvansal üretiminde kontrolü için büyük çaba sarf edilmektedir. Bu enfeksiyonların en önemlileri arasında da *Salmonella* enfeksiyonları bulunmaktadır.

Salmonella spp. enfeksiyonları, hem yumurta hem de et için üretilen kanatlı hayvanlarda yaygındır. Kanatlı hayvanlarda bu hastalıklar nedeniyle oluşan performans kayıplarının, teşhis/izleme ve kontrol programlarının ekonomik maliyeti oldukça yüksektir (1,2). Kanatlılarda enfeksiyona neden olan bazı *Salmonella* serotipleri, yumurta ve kanatlı eti ile insan gıda zincirine dahil olmaktadır. İnsanlarda görülen *Salmonella* enfeksiyonlarında bulaşma kaynağının önemli bir bölümünden kanatlı ürünlerinin sorumlu tutulması, gelişmiş ülkelerde kanatlı hayvanlara yönelik ülkesel *Salmonella* kontrol programlarının yürütülmesini zorunlu kılmıştır (2). Ülkemizde kanatlı üretiminin tavuk ile sınırlı olması nedeniyle, sadece tavuklarda *Salmonella* enfeksiyonları hakkında bilgi verilmiştir.

Tavuklarda *Salmonella* enfeksiyonlarına neden olan serotipler, konakçıya özgül (*S.Gallinarum*, *S.Pullorum*) ve konakçıya özgül olmayanlar (Paratifo etkenleri: *S.Enteritidis*, *S.Typhimurium*, *S.Infantis*, *S.Hadar*, *S.Virchow* gibi) olmak üzere iki temel bölümde incelenmektedir. Konakçıya özgül olan serotipler sadece kanatlılarda enfeksiyona neden olurken, konakçıya özgül olmayan *Salmonella* serotipleri, geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler.

Konakçıya özgül *Salmonella* serotipleri (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Pullorum* ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum*), pullorum hastalığı ve tavuk tifosuna neden olmaktadır. Pullorum hastalığı (*S.Pullorum*) ve tavuk tifosunda (*S.Gallinarum*), bulaşma kaynağını genellikle enfekte kanatlılar oluşturmaktadır ve bu enfeksiyonlar vertikal yolla da bulaşabilmektedir. Tavuklarda pullorum ve tavuk tifosu, bildirimi zorunlu hastalıklar arasında bulunmaktadır. Halk sağlığı açısından düşük öneme sahiptir (3).

Konakçıya özgül olmayan *Salmonella* enfeksiyonları, paratifo enfeksiyonları olarak tanımlanır. Tavuklarda paratifo, çok sayıda *Salmonella* serotipi tarafından oluşturulmaktadır. Bu serotipler arasında *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Agona*, *S. Stanley*, *S. Derby* ve *S. Thomson* sayılabilir. Konakçıya özgül olmadıklarından epidemi-

yolojileri, tavuk tifosuna göre daha karmaşıktır ve insan gıda zincirine kesimhanede dışkı-karkas, yumurtalarda ise dışkı-yumurta kabuğu bulaşması ile dahil olmaktadır. Tavuklara bulaşmada temel olarak yem, su, damızlık, tavuk dışındaki hayvanlar ve çevresel kaynaklar etkilidir. Endüstriyel tavuk üretiminin yapısı düşünüldüğünde, *Salmonella* bulaşmasını kontrol etmek oldukça güçtür ve detaylı bir çalışma yapılmasını gerektirir. Üretimin herhangi bir aşamasında tavuk bağırsaklarına kolonize olan salmonellalar, yumurta ve karkasa bulaşarak insanlarda potansiyel sağlık riskleri oluşturur. Ayrıca kümeslerde kullanılan altlık ve dışkı da çevresel bulaşmalar için bir kaynak oluşturmaktadır (1,2).

İnsanlarda görülen *Salmonella* enfeksiyonlarında başlıca bulaşma kaynağını, hayvansal kaynaklı gıdalar oluşturmaktadır. *Salmonella* ile bulaşık gıdaların uygun olmayan şekilde tüketilmesi, gastrointestinal problemlere neden olmaktadır. Ayrıca bir diğer önemli problem ise, özellikle *S. Typhimurium* başta olmak üzere *S. Infantis* ve diğer *Salmonella* serotiplerinde antibiyotiklere karşı çoklu dirençliliğidir (4). Türkiye'de son yıllarda broiler dışkı örneklerinden izole edilen *Salmonella* suşlarının serotiplendirilmesi sonrasında, dominant serotip *S. Infantis* bulunurken, izolatlar arasında *S. Typhimurium* serotipine rastlanmamıştır (yayınlanmış veri). Bu bulgu, özellikle insanlardaki serotip dağılımları ile ilgili epidemiyolojik çalışmalara veri sağlama açısından önemlidir.

Hayvanlarda enterik *Salmonella* enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisinde, zenginleştirme yöntemi kullanılmaktadır. Bu amaçla alınan materyaller (dışkı, yem, çevresel örnekler, hayvansal gıdalar) uluslararası standart metotla (ISO 6579:2002) incelenmektedir. Yaygın kullanılan bu yöntem, ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif-diferansiyel agarda izolasyon, tanımlama ve serotiplendirme basamaklarından oluşmaktadır (5). Bu süreç, serotiplendirme aşaması hariç olmak üzere ortalama 4-7 gün sürmektedir. Klasik yöntemle ilave olarak teşhiste faj tiplendirme, serolojik testler ve moleküler teknikler de kullanılmaktadır.

Hayvan dışkılarından, çevresel örneklerden, yem ve gıdalardan *Salmonella* izolasyon ve tanımlamasının uzun zaman alması, hızlı sonuç veren moleküler yöntemlerin kullanımını artırmıştır. Bu yöntemler arasında, direkt tanıya yönelik immünomanyetik separasyon (IMS), serotip ve cinse özgül tekli/çoklu konvansiyonel ve gerçek zamanlı PCR sayılabilir. Bu yöntemlerde teşhis süresi 24-48 saattir ve aynı mekanizma ile çalışan otomatize sistemler de geliştirilmiştir. Ayrıca tiplendirme amacıyla da moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. *Salmonella* izo-

latlarının moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi işlemi, suşlar arasındaki benzerliklerin/farklılıkların daha ayrıntılı belirlenmesi ve suşların birbirinden ayırt edilmesinde yarar sağlamaktadır. Bu yöntemler, virülans özellikleri ve antibiyotik dirençlilikleri gibi özel genleri saptamada da kullanılmaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri arasında PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) tiplendirme, MLST (Multilocus sequence typing) ile belirli genlerin amplifikasyonu, MLVA (Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis), ribotiplendirme ve dizi analizi sayılabilir (6,7).

Ülkemizde tavuk üretiminin, tavuk ürünlerinin tüketiminin ve uluslararası ticaretin artması, üretim aşamasında ve tavuk ürünlerinde *Salmonella* varlığının belirlenmesine yönelik çalışmalara ilgiyi artırmıştır. Çok sayıda materyalin hızlı ve doğru tanısında, moleküler yöntemler ve özellikle otomatize sistemler kullanılmaya başlamış ve hızlı bir artış göstermiştir. Aynı entegrasyon içinde bulaşma kaynaklarının araştırılması ve insan sağlığı açısından önem arz eden serotiplerin belirlenmesi için moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Son olarak antibiyotik direnç genlerinin araştırılmasında PCR temelli tekniklerinin kullanımına başlanmıştır. Moleküler tekniklerin kullanımı ile elde edilen bilgiler, tavuklarda

Salmonella enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojilerinin aydınlatılmasına ve kontrol programlarının belirlenmesine önemli katkı yapmaktadır.

Kaynaklar

1. Akan M. Kanatlılarda salmonella enfeksiyonları ve kontrolünde temel ilkeler. Mektup Ankara 2008; 6:3. http://www.veterinertavukculuk.org/uploading/dergiler/2008_2.pdf
2. Gast RK. Salmonella infection, pp: 619-65. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (eds), Diseases of Poultry. 2008, 12th ed. Blackwell Publishing, Iowa.
3. Barrow PA, Freitas Neto OC. Pullorum disease and fowl typhoid -- new thoughts on old diseases: a review. Avian Pathol 2011; 40: 1-13
4. Nogrady, N, Toth A, Kostyak A, Paszti J, Nagy B. Emergence of multidrug-resistant clones of Salmonella Infantis in broiler chickens and humans in Hungary. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 645-8.
5. World Organisation of Animal Health. Salmonellosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf
6. Clermont O, Cordevant C, Bonacorsi S, et al. Automated ribotyping provides rapid phylogenetic subgroup affiliation of clinical extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains. J Clin Microbiol 2001; 39: 4549-53.
7. Gautam RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other Gram negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol 1997; 35: 2977-80.

TÜRKİYE'DE ROTAVİRUSLARIN GENOTİPLERİ: TÜROSA VERİLERİ IŞIĞINDA AŞILARIN KAPSAYICILIĞI

Prof. Dr. Rıza DURMAZ*

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Rotavirus (RV)'lar, tüm dünyada ve ülkemizde beş yaşın altındaki çocuklarda görülen akut gastroenteritlerin en önemli etkenleridir. RV diyareleri yılda 453.000 çocuğun ölümüne sebep olmaktadır. Beş yaş altındaki çocuklarda görülen diyareye bağlı ölümlerin üçte birinden, tüm ölümlerin ise %5'inden RV sorumludur (1). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde diyare nedeniyle hastaneye yatırılan çocukların %25-50'sinde RV saptanmaktadır (2,3). Rotavirüslerle ilgili gastroenterit olguları, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde benzer sıklıkla görülmektedir birlikte; gelişmekte olan ülkelere mortalite daha yüksektir. Dünyada genelinde RV'a bağlı görülen çocuk ölümlerinin %80'i gelişmekte olan ülkelere görülmektedir (4).

RV'lar, zarfsız ve çift iplikcikli 11 segmentli RNA virüsleridir. Viral RNA kor, iç ve dış kapsid olmak üzere üç katlı bir kapsid ile çevrilidir. İç kapsid proteini olan VP6'nın antijenik ve genetik özelliklerine göre yedi majör RV grubu (A-G) belirlenmiştir. İnsan rotavirüsünün büyük bir çoğunluğu grup A'da yer almaktadır. Dış kapsiddeki iki yapısal proteinden VP7 (glikoprotein) ve VP4 (proteaza duyarlı protein), sırasıyla virüsün G ve P genotiplerini belirlemektedir (5,6). Bu proteinler koruyucu, serotipe özgül ve serotipler arası çapraz reaktif nötralizan antikor oluşumunu sağlayan epitoplara taşımaktadır (7). VP7 ve VP4 proteinleri konak özgüllüğünde, virülansta, nötralizan antikorların oluşturulmasında ve sınıflandırmada da önemli rol oynamaktadırlar (5,8). Viral RNA'nın segmentli özelliğinden dolayı suşlar arası genomik segment değişimleri görülmekte ve bunun sonucu olarak çok sayıda G ve P genotipleri ortaya çıkabilmektedir (8,9). Güncel olarak 27 G (G1-G27) ve 35 P (P[1]-P[35]) tipi tesbit edilmiştir (5).

Dünya genelinde sirküle olan RV genotiplerinin prevalansı yıllar ve bölgelere göre değişmektedir (7). Ancak, hastane orijinli epidemiyolojik çalışmalar son 20 yıl içinde dünyada G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] ve G9P[8] tiplerinin çocuklarda en yaygın olarak hastalığa sebep olduğunu göstermiştir (10,11). Özellikle G1P[8] devamlı olarak

güncelliğini korumakta olup, Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere ve Avustralya gibi gelişmiş ülkelerde görülen genotiplerin >70% fazlasını oluşturmaktadır (7). G12 ise dünyada yeni ortaya çıkan bir genotip olarak tanımlanmaktadır (5).

VP4 ve VP7 yüzey proteinleri nötralizan antikorların oluşumuna yol açtıklarından dolayı, aşı geliştirme çalışmalarında bu iki protein hedef alınmaktadır. Rotavirus gastroenteritlerinden korunmak amacıyla geliştirilmiş, 2006 yılından itibaren birçok ülkede lisans almış ve kullanıma girmiş iki oral attenüe RV aşısı [Rotarix™ (GlaxoSmithKline, Belgium) ve RotaTeq™ (Merck & Co. Inc., USA)] mevcuttur. **Rotarix™** monovalan bir aşı olup, insan RV 89-12 suşunu (G1P[8]) içermektedir (12). Aşıda bulunan G1 dünyada yaygın serotiptir. P[8] genotipi ise klinik öneme sahip olan G3, G4 ve G9 serotipleriyle ortak antijenler bulundurmaktadır (13). Rotarix (R1) aşısı G1, G3, G4 ve G9 tipleri tarafından oluşturulan RV gastroenteritlerine karşı yüksek oranlarda koruma sağlamasına karşın, G2 tipine karşı koruyuculuğu düşüktür (13). Latin Amerika ülkelerinde G2[P4]'e karşı %39-42 (14,15), Avrupa ülkelerinde ise %75 oranlarda çapraz koruyuculuk elde edilmiştir (13). Rotarix aşısının akut gastroenteritleri önlemedeki etkinliği ülkelere göre de değişim göstermektedir. Aşının koruma oranları, Güney Afrika'da %70, Malawi'de %49, Hong Kong, Tayvan ve Singapur'da %96, Avrupa ülkelerinde ise %87-96 olarak bildirilmektedir (16,17). **RotaTeq™** ise pentavalan, canlı-attenüe, insan-sığır reasortman aşısıdır. RotaTeq aşısında iskeleti oluşturan bir sığır virus tipi (WC3) ile insan rotavirüsünün en yaygın G (G1, G2, G3, G4) veya P (P1A[8]) tiplerinin yüzey proteinleri bulunmaktadır (17,18). Üç doz halinde uygulanan bu aşı ile G1-G4 ve G9 serotiplerine karşı yüksek oranlarda (%82-95) koruma sağlanabilmektedir (19-21). Yapılan kapsamlı bir derlemede aşıların etkinlikleri şöyle özetlenmiştir: Rotarix bütün RV diyarelerinde %70, ağır rotavirus diyarelerinde %80 koruma sağlamıştır. Benzer şekilde RotaTeq için bu değerler sırayla %73 ve %77'dir. Her iki aşı hastaneye yatışı gerek-

* Türkiye verilerinin sunulduğu bu çalışma, Rıza Durmaz, Atilla T. Kalaycıoğlu, Zekiye Bakkaloğlu, Sümeysa Acar, Gülay Korukluoğlu, Alper Karagöz ve TÜROSA Çalışma Grubu tarafından gerçekleştirilmiştir.

TÜROSA Çalışma Grubu: Mehmet Ali Torunoğlu, Ahmet Özlü, Selma Gökahmetoğlu, Adnan Öztürk, Ekrem Yaşar, Fatma Bacalan, Özlem Özgür Gündeşlioğlu, Ayşen Bayram, Nilgün Çöl Araz, Betigül Öngen, Ayper Somer, Ayşegül Çopur Çiçek, Selim Dereci, Mustafa Altındış, Ayşegül Bükülmez, Gönül Tanır, Şengül Özkan, Banu Bayraktar, Nazan Dalgıç Karabulut, Erdal Ince, Haluk Güriz, Bilge Kocabaş, Gülendamlı Bozdayı, Hasan Tezer, Cafer Eroğlu, Ahmet Güzel, Faruk Aydın, Erol Erduran, Gül Durmaz, Bahadır Fezyioğlu, Melike Emiroğlu, Zafer Çetinkaya, Figen Temel Keleşyan, Hakan Uslu, Ferda Aktaş, Ömer Kılıç, Mustafa Hacimustafaoğlu, Solmaz Çelebi, Cüneyt Özakin, Candan Çiçek, İlker Devrim, Süleyman N. Bayram, Yelda Sorguç, Ümit Çelik, Hülya Zararsız, Emel Sesli Çetin, Metehan Öz, Çiğdem Kuzucu, Ayşe Selimoğlu, Hüseyin Gündüacioğlu, Oğuz Tuncer, Fadile Zeyrek, Alpaz Çakmak, Sebahat Aksaray, Çağatay Nuhoğlu, Yunus Bulut, Seda Tezcan, Esin Ark, Ebru Sözen, Dilek Yılmaz, Zümrüt Sahbudak Bal, Semra Şen, Eulaş Saz, Derya Mutlu, Aygen Yılmaz, Emine Kocabaş.

tiren RV diyarelerini %80 oranında önlemiştir (22). Diğer bir derlemede, her iki RV aşısının kapsamalarında olmayan genotiplere karşı da çapraz koruyuculuk sağladıkları belirtilmiştir. Derlemede, Afrika'da yapılan çalışmalarda Rotarix aşısının diğer genotiplere karşı çapraz koruyuculuk oranının %60-64; Avustralya, Avrupa ve Amerika'da yapılan çalışmalarda ise her iki aşının kapsamalarında olmayan genotiplere karşı çapraz koruyuculuk oranlarının %71-95 olduğu rapor edilmiştir (17).

Rotavirus aşuları ülkemizde bulunmaktadır; ancak ulusal aşılama programına alınmamıştır. Ulusal aşılama öncesi dönemde; ülkemizde değişik iller ve farklı yıllarda yapılan çalışmalarda, 2000-2010 yıllarında RV genotiplerinin büyük bir çoğunluğunun G1-G4 içerisinde yer aldığı gösterilmiştir (23-27). Ankara'da yapılmış olan iki çalışmada G9P[8] prevalansında artış olduğu ve P2A[6] ve P[5] gibi yeni genotiplerin ortaya çıktığına dikkat çekilmiştir (24, 28).

Rotavirus genotiplerinde yıllara ve çalışma gruplarına bağlı olarak önemli dalgalanmalar gözlenmesi nedeniyle aşı öncesi ve sonrası dönemde birçok ülkede RV suşlarının genotipik karakterizasyonu ve hastalık yükünün izlenmesi amacıyla sürveyans programları yürütülmektedir. Ulusal aşılama programına alınmadan önceki dönemde ülkemizde sirküle olan RV genotiplerini belirlemek ve aşılamanın genotiplerin prevalansında oluşturabileceği olası etkileri izlemek amacıyla, çok sayıda il ve merkezi kapsayan sentinel Türkiye Rotavirus Sürveyans Ağı (TÜROSA) kurulmuştur. Bu sunumda, TÜROSA kapsamında, 2013 yılında çalışılmış olan örneklerin sonuçları özetlenmiştir.

TÜROSA Verileri

TÜROSA çalışması, 20 ilden toplam 27 merkezin katılımıyla yürütülmüştür. Çalışmaya katılan merkezler, akut gastroenterit nedeniyle hastaneye yatırılan veya acilde gözetim altında tutulan 0-59 aylık çocuklardan aldıkları gaita örneklerinde, rotavirus antijeni araştırmışlardır. Antijen pozitif örnekler, genotiplendirme çalışmalarının yapılacağı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK)'na gönderilmiştir. THSK Ulusal Viroloji Referans Merkez Laboratuvarında RNA ekstraksiyonu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarında ise rotavirus G ve P genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır. Genotip belirlemek için ilk aşamada G ve P genlerinde bulunan ve mevcut genotiplerin hepsinde ortak olan bölgeleri hedefleyen primerlerle ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapılmıştır. İkinci aşamada; birinci aşamadan elde edilen DNA amplikonları kalıp olarak kullanılarak her bir genotip için özgül primerler yardımıyla "semi-nested" multiplex PCR yöntemiyle P ve G genotipleri belirlenmiştir (8,29). PCR ile genotipi belirlenemeyen örnek için dizi analizi uygulanmıştır.

Bir yıllık sürede RV antijeni pozitif olan 1419 örnek incelenmiştir. İncelemeye alınan örneklerin 220 (%15.5)'sinde antijen pozitif olduğu halde, RT-PCR yöntemiyle rotavirus RNA saptanamamıştır. Rotavirus RNA pozitif olarak saptanan 1199 örnekten altı tanesi kısmen tiplendirilebilmiştir. Dört örnekte G genotipi belirlendiği

halde P genotipi belirlenememiş, iki örnekte ise tersi olmuştur. Toplam sekiz G, altı P ve 42 farklı G-P kombinasyonu saptanmıştır. G9 (n=605, %50.5) örneklerin yarısında saptanan yaygın genotip olup, bunu sırasıyla G1 (n=301, %25.1), G2 (n=108, %15), G3 (n=55, %4.6), G4 (n= 42, %3.5), G12 (n=13, %1), G8 (n=10, %0.8) ve G10 (n=4, %0.3) genotipleri izlemektedir. P[8] baskın genotip olup örneklerin 1003 (%83.6)'ünde saptanmıştır. Diğer P genotipleri ise P[4] (n=201, %16.8), P[9] (n=3), P [6] (n=5), P[11] (n=2) ve P[10] (n=1) olarak belirlenmiştir. Beş yaygın G genotipi (G1-G4 ve G9) ve iki yaygın P tipi (P[8], P[4]) sırasıyla örneklerin %98.7 ve %99'unda saptanmıştır. En yaygın G ve P kombinasyonu G9P[8] olup suşların 509 (%42.5)'ünde tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla G1P[8] (265 suş, %22), G2P[8] (100 suş, %8.4), G2P[4] (72 suş, %6), G3P[8] (44 suş, %3.7) ve G4P[8] (36 suş, %3) genotipleri izlemiştir. Bu altı yaygın genotip suşların %85.7'sini içermektedir. Geriye kalan 139 suş (%11.7) ender görülen 21 farklı genotip kombinasyonu içerisinde yer almıştır. Karışık genotip saptanan suşların oranı %2.75 (n=33) olarak bulunmuştur.

Yaygın olan genotiplerin bölgeler arasındaki dağılımına bakıldığında; G9P[8] genotipi İç Anadolu (%61.8), Karadeniz (%50), Marmara (%56.7) ve Ege (%61.9) bölgelerinde baskın durumda iken; bu genotip Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde G1P[8]'den sonra ikinci sırada yer almaktadır. Doğu Anadolu bölgesinde G1P[8]'in oranı %40.5, G9P[8]'inki %33.3; Güneydoğu Anadolu bölgesinde G1P[8]'in oranı %32.8, G9P[8]'inki %28.5 olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak mevcut RV aşılarının ülkemizde saptanan genotipleri kapsayıcılık oranlarının oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Doğrudan aşılama kapsamında olan genotipler dikkate alındığında; Rotarix aşısının kapsayıcılık (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8]) oranı %71.36, RotaTeq aşısının ise (G1P[8], G2P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8]) %79.71 olarak bulunmuştur. Her iki aşısındaki G veya P genotiplerden herhangi birinin, saptanan G-P genotip kombinasyonlarında bulunmasına bağlı olarak oluşacak çapraz koruyuculuk dikkate alındığında ise; Rotarix aşısının kapsayıcılığı %3, RotaTeq'inki %99.3'e çıkmaktadır.

Kaynaklar

1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12(2):136-41.
2. Cunliffe NA, Kilgore PE, Bresee JS, et al. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull World Health Organ* 1998; 76(5):525-37.
3. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8(9): e72788
4. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2):304-6.
5. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011; 156(8):1397-413.
6. World Health Organization. Generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains. http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_IVB_08.16_eng.pdf

7. Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis* 2010; 202 Suppl: S43-8.
8. Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 2004; 31(4):259-65.
9. Ramig RF. Genetics of the rotaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51:225-55.
10. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005; 15(1):29-56.
11. Vizzi E, Piñeros O, González GG, Zambrano JL, Ludert JE, Liprandi F. Genotyping of human rotaviruses circulating among children with diarrhea in Valencia, Venezuela. *J Med Virol* 2011; 83(12):2225-32.
12. Bernstein DI, Ward RL. Rotarix: development of a live attenuated monovalent human rotavirus vaccine. *Pediatr Ann* 2006; 35(1):38-43.
13. Rotarix Product Monograph. GlaxoSmithKline Inc, Ontario. <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Rotarix.pdf>
14. Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(8):745-53.
15. Borges AM, Dias e Souza M, Fiaccadori FS, Cardoso DD. Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix™ vaccine in Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(4):499-501.
16. World Health Organization. Detailed review paper on rotavirus vaccines. WHO Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Immunization, April 2009. http://www.who.int/immunization/sage/3_Detailed_Review_Paper_on_Rota_Vaccines_17_3_2009.pdf
17. Yen C, Tate JE, Hyde TB, et al. Rotavirus vaccines: Current status and future considerations. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(6). [Epub ahead of print]
18. Offit PA, Clark HF. RotaTeq: a pentavalent bovine-human reassortant rotavirus vaccine. *Pediatr Ann* 2006; 35(1):29-34.
19. Vesikari T, Itzler R, Matson DO, et al. Efficacy of a pentavalent rotavirus vaccine in reducing rotavirus-associated health care utilization across three regions (11 countries). *Int J Infect Dis* 2007; 11 Suppl 2:S29-35.
20. El Khoury AC, Mast TC, Ciarlet M, Markson LE, Goveia MG. Projecting the effectiveness of RotaTeq® against rotavirus-related hospitalizations and deaths in six Asian countries. *Hum Vaccin* 2011; 7(5):506-10.
21. Ciarlet M, Schödel F. Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Vaccine* 2009; 27 Suppl 6:G72-81
22. Soares-Weiser K, Maclehorse H, Bergman H, et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2:CD008521.
23. Meral M, Bozdayı G, Ozkan S, Dalgıç B, Alp G, Ahmed K. Rotavirus prevalence in children with acute gastroenteritis and the distribution of serotypes and electropherotypes. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1):104-12.
24. Bozdayı G, Dogan B, Dalgic B, et al. Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *J Med Virol* 2008; 80(4):733-40.
25. Cataloluk O, Iturriza M, Gray J. Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. *Epidemiol Infect* 2005; 133(4):673-8.
26. Kurugöl Z, Geylani S, Karaca Y, et al. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *Turk J Pediatr* 2003; 45(4):290-4.
27. Ceyhan M, Alhan E, Salman N, et al. Multicenter prospective study on the burden of rotavirus gastroenteritis in Turkey, 2005-2006: a hospital-based study. *J Infect Dis* 2009; 200 Suppl 1:S234-8.
28. Tapisiz A, Karahan ZC, Çiftçi E, İnce E, Doğru Ü. Changing patterns of rotavirus genotypes in Turkey. *Curr Microbiol* 2011; 63(6):517-22.
29. Simmonds MK, Armah G, Asmah R, et al. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol* 2008; 42(4):368-73.

VİRAL GASTROENTERİTLERİN LABORATUVAR TANISINDA GÜNCEL DURUM

Doç. Dr. Gülendem BOZDAYI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Viral gastroenteritler; rotavirus, enterik adenovirüsler, insan kalısivirüsleri (Calicivirus), astrovirüs, koronavirüsler, torovirüsler, Aichi virüs ve pikobirnavirüsler tarafından oluşturulur. Son yıllarda, ülkemizde salgınlara yol açan norovirüs (NoV) da gündemi oldukça meşgul etmektedir. Bu etkenlerden özellikle rotavirus ve NoV çocukluk çağında sıklıkla karşımıza çıkan ve morbidite, mortalite oranı oldukça yüksek olan viral etkenlerdir.

Rotavirus, dünya genelinde 5 yaş altı çocuklarda görülen akut gastroenteritlerin en önde gelen etiyolojik ajanıdır. Şiddetli rotavirus diyareleri sebebiyle %85'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünya çapında her yıl 611.000 çocuk hayatını kaybetmektedir (1). Beş yaş altındaki çocuklarda akut gastroenterit nedeniyle hastane yatışlarının ortalama %39'undan (%25-58) rotavirüsler sorumludur (2,3). Dünyada en sık görülen rotavirus tipleri G1-4, G9, P[8], P[4] ve P[6]'dır. Serotip G1P[8] (%64.7), G2P[4] (%12), G4P[8] (%8.5) ve G3P[8] (%3.3) çocuklardaki rotavirus diyarelerinin %88.5'inden sorumlu tutulmaktadır (4). Çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının klinik spektrumu, asemptomatik enfeksiyondan dehidratasyon ile seyreden ciddi diyare ve ölüme kadar değişmektedir. İnkübasyon periyodu 1-4 gündür. Rotavirüsler esas olarak fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Ancak rotavirus oda ısısında uzun süre stabil kaldığından kontamine yüzeye temas ile kontamine su ve yiyeceklerle de bulaşabilmektedir (5). Hastalıktan korunma esas olarak bağırsak lümenindeki antikorlarla, özellikle IgA ile sağlanmaktadır. İlk olarak bir hafta sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgG cevabı oluşmakta, 1-4 ay kadar sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgG ve IgA cevabı gelişmektedir. Bir yıl sonra serumda özgül IgG cevabı devam etmekte ancak IgA saptanmamaktadır (6).

Son yıllarda yapılan çalışmalar NoV'un dünyada ve ülkemizde sporadik veya salgınlara sebep olacak şekilde gastroenteritlere neden olduğunu göstermektedir. NoV salgınları sağlık sistemlerinde, turizm ve yemek endüstrisinde büyük ekonomik sıkıntı ortaya çıkarmakta ve ciddi iş gücü kayıplarına neden olmaktadır. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda ve yaşlılarda daha yaygın olarak görülmektedir. En sık karşılaşılan genogrup GII ve onun genotipi GII.4'tür. Gıda ve su kaynaklı viral gastroenteritlerin içerisinde önemli bir yeri vardır. Oldukça bulaşıcı ve birçok çevresel etkene karşı dirençli olması sayesinde kısa sürede büyük popülasyonları etkileyebilmesi nedeniyle hızlı laboratuvar tanısı önemlidir. Bu hızlı tanıda daha çok ELISA ve immünokromatografi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, tanı yöntemlerinin karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda RT-PCR gibi moleküler yöntemler kullanıldığı zaman, ELISA'ya göre daha yüksek oranda pozitiflik saptanmaktadır. Ayrıca,

laboratuvar tarafından NoV tanısı konulması hastaların gereksiz antibiyotik kullanmasını da engellemiş olacaktır.

Viral gastroenteritlerin tanısında kullanılan testler aşağıda listelenmiş ve özellikleri tabloda belirtilmiştir.

İmmünokromatografik test: Striplerin kullanıldığı viral antijen testleridir. Kullanımı basit, hızlı ve ucuzdur. Tek olguların çalışılması için uygundur. Duyarlılığı lateks agglütinasyon testine göre yüksek, ELISA testine benzer veya biraz düşüktür. Negatif sonuçlar PCR ile doğrulanmalıdır.

ELISA: Antijen testidir. Tek olguların tanısı için önerilmez. Rutin tanı ve tarama için standart test olup çok sayıda örnek çalışılabilir. PCR testine göre duyarlılığı düşüktür, özgüllüğü ise benzerdir. Salgınlarda uygun tanı testidir, ancak negatif sonuç RT-PCR ile doğrulanmalıdır.

Lateks agglütinasyon testi: Antijen testidir. Duyarlılığının ELISA testinden oldukça düşük olması dezavantajdır. Tarama testi olarak kullanımı önerilmez.

PCR: Enterik virüsler için altın standart kabul edilir. Multipleks PCR testleri mevcuttur (7,8).

Real-time PCR: Konvansiyonel RT-PCR'a göre 1-4 log daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (7,8).

Genotipleme: Epidemiyolojik amaçlar için NoV genogrup tespiti konvansiyonel RT-PCR ürünlerinin dizi analizi ile, rotavirus G ve P genotiplerinin tanısı ise konsensus PCR sonrası genotipe özgül multipleks PCR testleri ve dizi analizi kullanılarak referans laboratuvarında yapılır.

Kaynaklar

1. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-6.
2. Şimşek Y, Bostancı İ, Bozdayı G ve ark. 0-5 Yaş çocuklarda akut gastroenteritte rotavirus sıklığı ve serotip özellikleri. *Türkiye Klinikleri Pediatri Derg* 2007; 16: 165-70.
3. Kurugöl Z, Geylani S, Karaca Y, et al. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *Turkish J Pediatr* 2003; 45(4): 290-4.
4. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005; 15: 29-56.
5. Yarkin F. Gastroenterit virüsleri, s: 245-9. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (ed), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2004, Güneş Kitabevi, Ankara.
6. Valezquez FR, Matson DO, Guerrero ML, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* 2000; 182(6): 1602-9.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep* 2011; 60(RR-3):1-18.
8. Pang X, Lee B, Chui L, Preiksaitis JK, Monroe SS. Evaluation and validation of real-time reverse transcription-PCR assay using the LightCycler system for detection and quantitation of norovirus. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4679-85.

Tablo. Viral gastroenterit tanısında kullanılan testlerin özellikleri

Test (Süresi)	Hedef virus	Kitin adı	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Kaynak no
İmmünokromatografik test (15-20 dk)	Norovirus	RIDA@QUICK	61.4-83.3	87.5-100	18-22
		SD Bioline	54-62	67-98.6	18,23
	Rotavirus	RIDA@QUICK	88.8	100	24
		CombiStrip (Coris)	76.5	68	25
		Dipstick Eiken	95.8	93.3	26
		ROTAstrip (Coris)	99	96	27
Adenovirus	RIDA@QUICK	28.6	100	24	
ELISA antijen testi (1-3 saat)	Norovirus	IDEIA Norovirus	58.9-78.9	93.9-100	28,29
		RIDASCREEN (R-Biopharm)	40-78.3	83.3-97	21,24,29-31
	Rotavirus	RIDASCREEN	82.1	100	27
		IDEIA (Dako)	96	99	33
		Premier Rotaclone	98.1	97.5	32
		VIDAS (bioMerieux)	76.8	100	20,34
	Astrovirus	RIDASCREEN	100	93-100	35
Adenovirus	Novitec	85			
Lateks agglütinasyon testi (2-5 dk)	Rotavirus	Slidex (bioMerieux)	85.7	100	33
		MUREX (Abbott)	68	99	27
		Pastorex (Biorad)	85.9	97.7	36
	Adenovirus	Adenolex	46	99	37
PCR testi (1-2 gün)	Norovirus	Argene	92.8	100	29
		Cepheid	91.2	100	
Gerçek zamanlık PCR testi (1-2 gün)	Rotavirus	Seeplex	100	100	38
	Adenovirus	Seeplex	100	100	
	Norovirus	Seeplex	97	99.4	

VİRAL KAYNAKLI GASTROENTERİT SALGINLARINDA TÜRKİYE VE DÜNYADAKİ GÜNCEL DURUM

Doç. Dr. Gülay KORUKLUOĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Viroloji Laboratuvar Şefliği, Ankara

Akut gastroenteritler, özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Etkenler viral, bakteriyel ve paraziter veya çoklu ajanlar olabilir (1). Özellikle son yıllarda tanınan mikrobiyoloji alanında ortaya çıkan yeni metodolojiler, gastroenterit salgınlarnın etiyolojisinin tanımlanmasında, herbir ajanın oynadığı rolün belirlenmesinde, farklı geçiş yollarının saptanmasında ve kontrol yöntemlerinin belirlenmesinde ciddi kazanımlar sağlanmasına neden olmuştur. 1970'li yıllardan önce gastroenterit ataklarının %80'inin etyolojik tanısını yapmak mümkün olmamıştır. Ancak 1972 yılında ishali olan hasta örneklerinin elektron mikroskopunda incelenmeye başlanmasıyla, norwalk virus, rotavirus, astrovirus, enterik adenovirus ve sapovirus gibi yeni enterik viruslar tanımlanmış ve bunlarla ilgili olarak tüm dünyada elektron mikroskopiden farklı tanı yöntemleri ve korunma konularında geniş araştırmalar başlatılmıştır. Özellikle 1990'larda viral etkenlerin genetik sekanslarının belirlenmesi ile yeni moleküler yöntemler tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (2). Tanınan kapasitedeki bu artışa bağlı olarak, dünyada yapılan salgın incelemelerinin sayısı giderek artmış ve enfeksiyöz ishallerde virusların %30-70'lere varan oranlarla ilk sırayı aldıkları bildirilmiştir (3).

Dünyada ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak izlenen viral kaynaklı gastroenterit enfeksiyonları ciddi bir hastalık yüküne de neden olmaktadır. Etkenin hızlı tanısı, etkin bir enfeksiyon kontrolü ve olgu/salgın yönetimi imkanı vermekte, ayrıca epidemiyolojik çalışmalarda önemli bir temel oluşturmaktadır. Fekal kaynaklı bakteriyel, viral ve/veya paraziter patojenler su kaynaklarını kontamine ederek salgınlarnı başlatabilirler. Patojenik ajanın su kaynaklı yayılımı; etkenin sudaki canlılığını koruyabilmesine ve duyarlı bireylerde hastalık oluşturmak için gerekli enfeksiyöz yüke bağlıdır. Enfeksiyöz yük ve çevresel şartlarda canlılık süresi, patojenlere göre farklılık gösterdiği için salgın etkenlerinin laboratuvar tanısı önemlidir. Olası gastroenterit etkenlerinin tanısının hızlı ve doğru olarak yapılması etkin tedavi olanağı sağlayacak, viral kaynaklı gastroenteritlerde gereksiz antibiyotik kullanımını engelleyecek, ayrıca antimikrobiyal tedavi gerektiren durumlarda doğru antibiyotik seçimi için yol gösterici olacaktır.

Ülkemizde bir çok merkezdeki hastanelerde, enterit tanısıyla yatan hastalarla ilgili yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak 2009 yılından itibaren ülke genelinde farklı zamanlarda toplumu etkileyen, özellikle gıda ve su kaynaklı salgın incelemelerine ait örnekler laboratuvarı-

mıza gönderilmektedir. 2010 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı tarafından hazırlanmış olan "Gıda ve Su Kaynaklı Salgınlarda Gönderilecek Örnekler İçin İl Sağlık Müdürlüğü Saha Rehberi" esas alınarak oluşturulmuş bir örnek yönetim algoritması mevcuttur. Bu kapsamda 2009-2011 yılları arasında laboratuvarımızda Türkiye'nin çeşitli illerinden gönderilen toplam 561 örnek incelenmişken, 2012-2014 Mayıs arasında bu sayı 1847'dir. Bu artış, hem salgın ve örnek yönetimi algoritmasının artan oranda kullanılmaya başlanması, hem de viral ajanlar nedeniyle oluşan salgınlarnın tanısının kısa sürede yapılması nedeniyledir. Son iki yılda gelen örneklerin %11.1'i norovirus, %5.6'sı rotavirus, %2.2'si adenovirus ve %1'i astrovirus olarak tanımlanmıştır. Bu oranlar viral kaynaklı enterit etkenleri açısından dünyada yapılan araştırmalarla uyumludur (4,5). Özellikle son yıllarda moleküler yöntemlerin yaygınlaşması nedeniyle, tüm dünyadan bildirilen gastroenterit etkeni olarak viral ajanlara ait araştırmaların sayısında ciddi bir artış görülmektedir (6-9). Dünya genelinde yapılan araştırmalar incelendiğinde, norovirus ve rotavirus, en sık karşılaşılan enterit etkenleri olarak karşımıza çıkmaktadır ve her iki etkenle ilgili araştırmaların sayısı da giderek artmaktadır. Rotavirus enfeksiyonlarının özellikle çocukluk çağı ishallerinin ve ishale bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sırayı aldığı düşünüldüğünde, bu konuda yapılan araştırmaların değeri artmaktadır. Bu konudaki en önemli gelişme ise, rotavirusa karşı geliştirilen aşıdır ve dünya genelinde bu aşıyla hastalık yükünde ve ölüm oranında ciddi bir düşüş sağlanmıştır (10). Norovirus ile ilgili yapılan araştırmalarda ise, salgınlara neden olan yeni genotipleri ve "histoblood grup antijenleri"yle ilişkili olan genetik duyarlılığın saptanması gibi virusun epidemiyolojisini, geçiş yollarını ve fizyopatolojisini açıklayacak önemli bilgilere ulaşılmıştır (5,11,12). Ancak tüm bu başarılı çalışmalara rağmen, yine de her iki ajanla ve diğerleriyle ilgili olarak, virüslara bağlı salgınlarda ölüm oranlarının ve dünya genelinde hastalık yükünün azaltılması için araştırmaların artarak devam etmesi gerekmektedir (13).

Kaynaklar

1. Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, et al. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). PLoS One 2012; 7(3):e33754.
2. Glass RI. Beyond discovering the viral agents of acute gastroenteritis. Emerg Infect Dis 2013; 19(8):1190-1.
3. Rovida F, Campanini G, Piralla A, et al. Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 77(3):231-5.

4. Chen SY, Chiu CH. Worldwide molecular epidemiology of norovirus infection. *Paediatr Int Child Health* 2012; 32(3):128-31.
5. Hoffmann D, Mauroy A, Seebach J, et al. New norovirus classified as a recombinant GII.g/GII.1 causes an extended foodborne outbreak at a university hospital in Munich. *J Clin Virol* 2013; 58(1):24-30.
6. Bereciartu A, Bok K, Gómez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2002; 25(2):197-203.
7. Al-Rashidi A, Chehadeh W, Szücs GG, Albert MJ. Different norovirus genotypes in patients with gastroenteritis in Kuwait. *J Med Virol* 2013; 85(9):1611-8.
8. Sai L, Wang G, Shao L, et al. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in adults with acute gastroenteritis in Ji'nan, China. *Arch Virol* 2013; 158(11):2315-22.
9. González GG, Liprandi F, Ludert JE. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol* 2011; 83(11):1972-82.
10. World Health Organization. Generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains. http://www.who.int/immunization/documents/WHO_IVB_08.16/en/
11. van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 2013; 18(1):8-9.
12. Ruvoën N, Le Pendu J. Genetic susceptibility to norovirus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2013; 61(1):28-35.
13. Karve S, Krishnarajah G, Korsnes JS, Cassidy A, Candrilli SD. Burden of acute gastroenteritis, norovirus and rotavirus in a managed care population. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(6). [Epub ahead of print]

TOXOPLASMA GONDII

Prof. Dr. A. Yüksel GÜRÜZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir

Toxoplasma gondii, insanların da dahil olduğu geniş bir konak yelpazesi olan ve medikal önemi yüksek bir protozoon parazit olarak kabul edilmektedir. *T. gondii* enfeksiyonu immün sistemi sağlam kişilerde genellikle selim seyirli iken özellikle AIDS ve immün baskılayıcı tedavi alan hastalarda (organ ve kemik iliği transplantasyonu, kanser kemoterapisi) yüksek morbidite ve mortalite göstermektedir (1,2). Günümüzde gerçekleştirilen özel teknik ve ileri donanımlarla artık pek çok organ ile dokunun transplantasyonu ve kemoterapi başarıyla yapılmaktadır. İnsanlara yeniden yaşama imkanı tanıyan transplantasyonların sonrasında da toksoplazmozis hayati tehdit eden bir nitelik kazanabilmektedir. İmmün sistemi baskılanmış olan hastalarda klinik tablo genelde kronik latent enfeksiyonun reaktivasyonu, nadiren de akut akkiz enfeksiyon şeklinde gelişmekte, tedavi edilmeyen olguların %99'unun ölümlerine sonucunda bildirilmektedir (1-5).

T.gondii enfeksiyonunun primer tanısı, özgül anti-toksoplazma antikorlarının gösterildiği serolojik testler ile yapılır. Ayrıca akut toksoplazmozis tanısı IgG ve IgM antikorlarının gösterilmesi ile sağlanmaktadır. IgG antikorlarının saptanmasında Sabin Feldman Dye testi, indirekt floresan antikor testi (IFAT), aglütinasyon testleri, ELISA ve IgG avidite testleri kullanılmaktadır. IgM *immunosorbent agglutination assay* (ISAGA) ve IgM ELISA-capture testleri de IgM antikorlarının tespiti için kullanılmaktadır. Bunun yanında bu serolojik testler ile enfeksiyonun başlama zamanı tam olarak tespit edilememektedir. Bazen enfeksiyon başlangıcından sonra da IgM varlığının ve/veya düşük IgG avidite oranının uzun süre devam etmesi nedeniyle enfeksiyonun yorumlanması zor olmaktadır (1,2,6).

İmmün sistemi baskılanmış hastaların toksoplazmozis tanısında anti-toksoplazma IgM seropozitifliğinin önemi üzerinde durulmaktadır (7). Özellikle seronegatif bir hastada transplantasyon sonrasında özgül antikorların saptanması veya seropozitif bir hastada IgM antikorunun saptanması tanısız açıdan kıymetli kabul edilmektedir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, uygulanan ağır immünsüpresyon nedeniyle kanda antikor seviyelerinde artışın gösterilmesi zorlaşmaktadır. Bazen IgM'nin oluşmadığı, IgG antikorlarında düzensiz sonuçlar alındığı veya erken dönemlerde hiç antikor yanıtı saptanmadığı gösterilmiştir (8-14). Bunun yanında serolojik testler transplantasyon hastalarında risk grubunun belirlenmesinde özgül antikorların saptanması açısından kıymetli kabul edilmektedir (14,15).

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda kesin tanı, doku biopsilerinde veya vücut sıvısı örneklerinden *T.gondii*

takizoit izolasyonu, biyopsi materyalinde histolojik yöntemlerle takizoit ve doku kistlerinin veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile parazit DNA'sının gösterildiği yöntemlerle konulmaktadır. Birkaç merkezde *T.gondii* izolasyonunda fare peritonuna ve hücre kültürüne inokülasyon yöntemi kullanılmasına rağmen, bu yöntemlerin özel donanımlı laboratuvar gerektirmesi ve zaman alıcı olması nedeniyle fazla tercih edilmediği belirtilmektedir (1,2,6,16).

Son yıllarda değişik ve çok küçük miktarlardaki tanı materyallerinde parazitin tespiti için yüksek duyarlılıklı PCR teknikleri geliştirilmiştir (14,15,17). Parazitin PCR ile gösterilmesinin kültür ve mikroskopiye göre daha duyarlı ve özgül olduğu iddia edilmektedir (13,18). Çeşitli hasta örneklerinde (BOS, humor aköz, BAL, balgam, kan, amnion sıvı, biyopsi örneği) aktif *T.gondii* enfeksiyonunun tanısı için PCR teknikleri başarı ile uygulanmaktadır. PR ile erken tanı konulması sonucu erken tedaviye başlanmakta, elde edilen iyi sonuçlar prognozu da olumlu etkilemektedir (16,19). Ayrıca gerçek zamanlı PCR, immün sistemi baskılanmış olan hastalarda parazit sayısını gösterebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu grup hastaların tedavisi, parazit sayısının düşmesi ile takip edilebilmektedir. Moleküler tanı, serolojik ve kültür yöntemleri ile kolay tanı alamayan bu grup hastalarda önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji laboratuvarında gerçek zamanlı PCR ile toksoplazmozis rutin moleküler tanısında RE geni hedef bölge olarak kullanılmaktadır (GenBank no: AF146527). RE geninin her bir suşta yaklaşık 200-300 kez tekrar ettiği, *T.gondii*'nin DNA araştırmaları için özgün bir gen olduğu bildirilmiştir (20). Gerçek zamanlı PCR ile hibridizasyon problemleri kullanılarak tek basamakta ve yaklaşık 50 dakikalık bir süre içinde 134 bp büyüklüğünde bir gen bölgesinin amplifikasyonu sağlanmaktadır.

Kaynaklar

1. Guy EC. Toxoplasmosis. Medicine 2014; 42(1):31-3.
2. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363: 1965-76.
3. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. Toxoplasma gondii, p: 3495. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2009, 7th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
4. Contini C, Cultrera R, Seraceni S, et al. The role of stage-specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated Toxoplasma gondii encephalitis in patients with AIDS. J Med Microbiol 2002; 51: 879-90.
5. Nissapatorn V, Lee C, Quek KF, et al. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients: a current situation. Jpn J Infect Dis 2004; 57: 160-5.
6. Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann Ist Super Sanita 2004; 40(1):81-8.

7. 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.
8. Assi MA, Rosenblatt JE, Marshall WF. Donor-transmitted toxoplasmosis in liver transplant recipients: a case report and literature review. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 132-6.
9. Botterel F, Ichai P, Feray C, et al. Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1648-50.
10. 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.
11. Maschke M, Dietrich U, Prumbaum M, et al. Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1167-76.
12. Soulier-Lauper M, Zulian G, Pizzolato G, et al. Disseminated toxoplasmosis in a severely immunodeficient patient: demonstration of cysts of toxoplasma antigen containing complexes in active toxoin bone marrow smears. *Am J Hematol* 1991; 38: 324-6.
13. Wendum D, Carbonell N, Svrcek M, et al. Fatal disseminated toxoplasmosis in a toxoplasma seropositive liver transplant recipient. *J Clin Pathol* 2002; 55(8): 637.
14. 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(10):1526-32
15. Caner A, Dönmez A, Döşkaya M, et al. Determining Toxoplasma high-risk autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients by systematic pre-transplant PCR screening of stem cell originated buffy coat. *Parasitol Int* 2012; 61(4):565-71.
16. Martino R, Bretagne S, Rovira M, et al. Toxoplasmosis after hemopoietic stem transplantation. Report of a 5-year survey from the Infectious Disease Working Party of the European Group for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1111-4.
17. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994; 331: 695-9.
18. Assi MA, Rosenblatt JE, Marshall WF. Donor-transmitted toxoplasmosis in liver transplant recipients: a case report and literature review. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 132-6.
19. De Medeiros BC, De Medeiros CR, Werner B, et al. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 24-8.
20. Cassaing S, Bessières MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3):720-4.

PNEUMOCYSTIS JIROVECIİ

Doç. Dr. Mert DÖŞKAYA

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir

İmmün süpresif hastalarda görülebilecek parazitolojik hastalıkların moleküler tanısında panel uygulama ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Hastalardan invazif yöntemlerle alınan örneklerde [bronkoalveoler lavaj (BAL) gibi] birden fazla parazitin (*Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Microsporidium* spp., *Strongyloides stercoralis*) tanısı gerçekleştirilebilmektedir. Bu parazitler hastalarda benzer klinik bulgular verebildiğinden hastaya ait DNA örneğinde aynı anda araştırılabilir. Bu parazitler içinde *P.jirovecii* moleküler tanısı Ege Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji Laboratuvarında (MolParLab) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile 2011 yılından bu yana başarıyla gerçekleştirilmektedir.

P.jirovecii, özellikle AIDS'li hastalarda ve bunun yanı sıra kanser, transplantasyon veya immün sistem bozuklukları için uzun süreli immün sistemi baskılayıcı tedavi alanlarda sıklıkla *Pneumocystis pnömonisi* (PcP)'ne sebep olmaktadır (1,2). Günümüzde en sık olarak, HIV pozitif olduklarını bilmeyen veya kombine anti-retroviral tedavi almayan (cART) hastalarda görülmektedir (1,3). Bu mikroorganizmanın kültürü yapılamadığından, PcP tanısı genelde solunum örneklerinden hazırlanan yaymaların çeşitli boya ile boyanarak mikroskopik incelenmesi, direkt floresan antikor yöntemleri veya PCR yöntemleri ile saptanması sonucu konulmaktadır. 1990'ların sonunda boyama ve immüno floresan yöntemlere göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip PCR yönteminin kullanımına başlanması ile PcP tanısı kolaylaşmıştır (4,5).

PcP'nin moleküler tanısında *P.jirovecii*'nin birçok geni araştırılmaktadır. Bunlar arasında; *major surface glycoprotein* (MSG), *dihydropteroate synthase* (DHPS), *dihydrofolate reductase* (DHFR), *internal transcribed spacer regions of the rRNA* (ITS), *mitochondrial large subunit rRNA* (mtLSUrRNA), *mitochondrial small subunit rRNA* (mtSSU rRNA), 5S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, HSP70, α -tubulin, *thymidylate synthase*, *Kex-1* ve *cdc2* sayılabilir (3,5,6-15). Son yıllarda gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) platformlarının geliştirilmesi, çapraz kontaminasyonu azaltarak özgüllüğü artırmış, hedef gen sayısının belirlenebilmesini ve hızlı sonuç verilebilmesini sağlamıştır.

MolParLab bünyesinde 2011 yılından bu yana gerçekleştirilen *P.jirovecii* tanısında Rt-PCR yöntemi ile *cdc2* geni araştırılmaktadır (4). PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüğünü azaltan önemli faktörlerden birisi de PCR inhibisyonudur (16,17). Yanlış negatif sonuç verilmesinin önüne geçebilmek için neredeyse bütün tanısız *P.jirovecii* moleküler yöntemlerinde internal inhibisyon kontrolleri kullanılmaktadır. İnternal inhibisyon kontrolleri olarak

insan geni veya hedef geni içeren plazmid kontroller, hasta örneğine eklenerek hasta örneği ile eş zamanlı çalışılmaktadır.

MolParLab bünyesinde gerçekleştirilen *P.jirovecii* tanısına yönelik Rt-PCR yöntemi daha önceden tarif edildiği gibi gerçekleştirilmektedir (4,18). Kısaca; 166 baz çiftlik *cdc2* gen parçasının (GENBANK No: AF026546) amplifiye edileceği reaksiyonda primerler [5'-AGG-TAGGAGAAGGTAAGAAA-3' (20 nt, ileri primer) ve 5'-GCTGTGCTTGAACCC-3' (16 nt, geri primer)] ve prob lar [5'-LC-TTAAAAAATCCGGCTAGAAGCAGAAG-3' (27 nt) ve 5'-GATCTTGAAAATGGACAATAGTAG-FL-3' (25 nt)] kullanılmaktadır. Her 20 μ l reaksiyon 5 μ l hasta DNA'sı veya kontroller, 1x FastStart karışımı (Roche), 4 mM MgCl₂, 0.4 μ M LC ve 0.2 μ M FL prob lar ve 0.5 μ M primerler içermektedir. Reaksiyon Rt-PCR cihazında, 95°C'de 10 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, 10 sn 95°C, 15 sn 55°C ve 15 sn 72°C'lik 45 döngü ile oluşturulmaktadır (4,18). *P. jirovecii cdc2* genini içeren pozitif kontrol plasmidi TOPO klonlama kiti ile tarif edildiği gibi hazırlanmıştır (4). Pozitif kontroller mikrolitrede 6x10⁵-6 adet *cdc2* kopya plazmid içeren 10 kat sulandırılmış örneklerden oluşmaktadır. Eksternal kontrol olarak, daha önceden mikroskopi ve PCR ile *P.jirovecii* saptanmış solunum örnekleri kullanılmaktadır. Her reaksiyonda distile su, DNA ile yer değiştirilecek negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Analiz LightCycler 1.2 cihazı ve LightCycler yazılımı (Roche) ile gerçekleştirilmektedir.

Kaynaklar

1. Wakefield AE. Pneumocystis carinii. Br Med Bull 2002; 61: 175-88.
2. Can H, Caner A, Döşkaya M, et al. Detection of Pneumocystis in the nasal swabs of immune suppressed rats using PCR and microscopy. Med Sci Monit Basic Res 2013; 19:62-7.
3. Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Comparison of six different PCR methods for detection of Pneumocystis carinii. J Clin Microbiol 1995; 33: 2785-8.
4. Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, et al. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of Pneumocystis from bronchoalveolar lavage fluid. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54: 169-75.
5. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of Pneumocystis jirovecii by two staining methods and two quantitative PCR assays. Infection 2009; 37: 261-5.
6. Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, et al. A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of Pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients. J Infect Dis 2004; 189: 1679-83.
7. Demanche C, Berthelemy M, Petit T, et al. Phylogeny of Pneumocystis carinii from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. J Clin Microbiol 2001; 39: 2126-33.
8. 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.

9. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; 336: 451-3.
10. Hunter JA, Wakefield AE. Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species. *J Eukaryot Microbiol* 1996; 43: 24-5.
11. Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1991; 337: 1378-9.
12. Sandhu GS, Kline BC, Espy MJ, et al. Laboratory diagnosis of *Pneumocystis carinii* infections by PCR directed to genes encoding for mitochondrial 5S and 28S ribosomal RNA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33: 157-62.
13. Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax* 2008; 63: 154-9.
14. Brancart F, Rodriguez-Villalobos H, Fonteyne PA, Peres-Bota D, Liesnard C. Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 381-7.
15. Kaiser K, Rabodonirina M, Picot S. Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii* hominis. *J Microbiol Methods* 2001; 45: 113-8.
16. Kern M, Böhm S, Deml L, Wolf H, Reischl U, Niller HH. Inhibition of *Legionella pneumophila* PCR in respiratory samples: a quantitative approach. *J Microbiol Methods* 2009; 79: 189-93.
17. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3741-51.
18. Döşkaya M, Caner A, Degirmenci A, et al. Degree and frequency of inhibition in a routine real time PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in Turkey. *J Med Microbiol* 2011; 60(Pt 7):937-44.

MICROSPORIDIUM TÜRLERİ

Doç. Dr. Ayşe CANER

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir

Microsporidium, omurgalı ve omurgasız geniş yelpazede konak seçiciliği gösteren, küçük, spor oluşturan, zorunlu hücre içi parazittir. Prokaryotlardan ökaryotlara geçiş paraziti olarak da tanımlanan *Microsporidium* daha çok tipik ökaryotik karakterler taşımaktadır (1-5). Günümüzde 160 cins içinde 1300 türü tanımlanmış olup, 14 türün insanlar için patojen olduğu bildirilmiştir. Bunlardan insanda en fazla *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis*'in hastalığa sebep olduğu yayınlanmıştır (6). Enfeksiyonun insanlara bulaş yolları tam olarak açık değildir. Dışkı, idrar ve solunum yolları sekresyonlarında bulunan sporlar enfeksiyon kaynağı olarak belirtilmiştir. Bulaş kişiden kişiye direkt olduğu gibi, su, süt, yiyecek, homoseksüel ilişki, yüzme havuzlarındaki sular, hayvan ve vektörler aracılığı ile de olabildiği gösterilmiştir (1,5,7,8).

Microsporidium, bağışıklık sistemi sağlam kişilerde ciddi bir hastalığa neden olmadığı için, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmektedir. Ancak mikrosporidiozisin, immüno-lojik problemi olmayan kişilerde de sıklıkla gastroenterit, solunum yolu enfeksiyonları, hatta körlüğe yol açtığına dair yayınlar bulunmaktadır (9,10). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda *Microsporidium* ların sıklıkla inatçı, yaşamı tehdit eden gastrointestinal semptomlara neden olmasının yanı sıra göz, beyin, solunum yolları, karaciğer ve safra yollarını da tutabildiği bildirilmiştir (1,5,8). HIV/AIDS hastalarında sıklıkla *E.bieneusi*'nin tespit edildiği ve en çok görülen klinik tablonun diyare olduğu belirtilmiş, enfeksiyonun yoğunluğu ile kliniği arasındaki ilişkinin hastanın immün durumu ile yakından ilgili olduğu bildirilmiştir (1,11). *Microsporidium* son yıllarda immün baskılayıcı tedavi alan organ transplantlı hastalarında, malign hastalıklarda ve diyabetes mellitus hastalarında fırsatçı parazit olarak sık görülmeye başlanmıştır (1,5,6,12). *Microsporidium* tanısında dışkı, bronkoalveoler lavaj sıvısı (BAL), balgam, idrar, aköz sıvı, periton sıvısı ve safra örnekleri gibi çeşitli vücut örnekleri kullanılmaktadır. Küçük ve hücre içi yerleşimli olmaları, ayrıca zor boyanmaları nedeniyle geleneksel tanı yöntemlerinin kullanılmasında zorluklar yaşanmaktadır. Günümüzde *Microsporidium* tanısında mikroskopi, kültür, antijen veya antikor arama, transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ve nükleik asit saptama teknikleri kullanılmaktadır (2,5,6,13,14).

Modifiye edilmiş trikrom boyamanın diğer boyama tekniklerine oranla daha yararlı olduğu bildirilmiştir (1,9,15). Son yıllarda kullanılan kalkoflor beyazı, uviteks 2B ve fungiflor gibi floresan boyama yöntemlerinin *Microsporidium* sporlarının aranmasında modifiye trikrom

boyama yönteminden daha duyarlı ve özgül olduğu gözlemlenmiştir (5,16). Bu boyama yöntemleri ile *Microsporidium* sporlarının, mantar hücrelerinden ayırımında yaşanan zorlukları aşmak ve duyarlılığı artırmak amacıyla, poliklonal ve monoklonal antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen immüno floresans (IFA) yöntemi kullanıma girmiştir (13,16). Serolojik testler, immün sistemi baskılanmış hasta grubunda immüno lojik yanıtın zayıflaması ile kanda bulunan antikor miktarının azalması, türlere özgü antijenlerin kolay üretilmemesi ve çapraz reaksiyon oluşturması nedeniyle tanıda çok yararlı olamamaktadır (7). TEM'nin dışkı ve vücut sıvısı örneklerinde özgülüğünün yüksek, duyarlılığının düşük olması, uzun zaman alması ve pahalı olması nedeniyle kullanım alanının oldukça kısıtlı olduğu bildirilmiştir (1,8,9,16).

Microsporidium'un moleküler tanısı için, en çok SSU ve LSU rRNA genlerinin farklı bölgeleri kullanılmaktadır. Bunun yanında ITS bölgesinin de hem tanı hem de *Microsporidium* türlerinin ayırımında kullanıldığı bildirilmiştir (1,17,18). *Microsporidium*'un spor duvarlarından DNA izolasyonu zor ve oldukça önemli bir basamaktır. Bunun için klasik DNA izolasyon yollarının yanında modifiye yöntemler de kullanılmaktadır. Son yıllarda bazı araştırmacılar tarafından, cam boncuklar ile oluşturulan mekanik parçalamanın veya kaynatmanın izolasyonda daha etkili olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca moleküler çalışmalarda önemli bir sorun, alınan örneklerde bulunan bazı maddelerin PCR'da inhibitör etki göstermesidir. Dolayısıyla inhibisyonu önlemek için, sığır serum albumini, immüno manyetik ayırma (IMS) ve sakroz flotasyon yöntemi kullanılmaktadır (1,5). Moleküler çalışmaların hem klinik, hem de çevreden alınan örneklerde kullanılan diğer mikroskobik yöntemlerden daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir (5,17). Geliştirilen multipleks gerçek zamanlı PCR teknikleri ile dışkı örneklerinde *E.bieneusi* ve *Encephalitozoon spp.*'un tanısında %100 özgülük ve duyarlılık saptandığı yayınlanmıştır (18). Özellikle mikrosporidiozisin epidemiyolojik çalışmalarında ve immün sistemi baskılanmış hastaların erken tanısında gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR)'ın hızlı ve güvenilir bir moleküler yöntem olduğu bildirilmiştir (5,17,18).

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji laboratuvarında, Rt-PCR ile *E.bieneusi* ve *Encephalitozoon spp.* rutin moleküler tanısında sırasıyla ITS ve SSU rRNA genleri hedef bölge olarak kullanılmaktadır (GenBank no: AF101198, U09929) (18). Rt-PCR ile hidroliz problemleri kullanılarak tek basamakta ve yaklaşık 45 dakikalık bir süre içinde 103 bp ve 214 bp büyüklüğünde gen bölgelerinin amplifikasyonu sağlanmaktadır.

Kaynaklar

1. Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 243-85.
2. Weiss LM. Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop* 2001; 78: 89-102.
3. Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shaddock JA. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect* 2000; 2: 709-20.
4. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 93-116.
5. Caner A, Gürüz Y. Microsporidium'larda moleküler çalışmalar. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H (ed), *Moleküler Parazitoloji*. 2009. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
6. Stark D, Barratt JL, van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4):634-50.
7. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 2004; 126: 145-66.
8. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 423-45.
9. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 426-61.
10. Cali A, Meisler D, Lowder CY, et al. Corneal microsporidiosis: characterization and identification. *J Protozool* 1991; 38: 215-7.
11. Franzen C, Müller A, Hegener P, et al. Detection of microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2294-6.
12. Sax PE, Rich JD, Pieciak WS, Trnka YM. Intestinal microsporidiosis occurring in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1995; 60: 617-8.
13. Koru Ö. Microsporidiasis. Korkmaz M, Ok ÜZ (eds), *Parazitolojide Laboratuvar*. 2011. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 23, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
14. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 485-92.
15. Sarfati C, Bourgeois A, Menotti J, et al. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 162-4.
16. Franzen C, Müller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* 2001; 3: 389-400.
17. Menotti J, Cassinat B, Sarfati C, Liguory O, Derouin F, Molina JM. Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1410-3.
18. Verweij JJ, Ten Hove R, Brienen EA, van Lieshout L. Multiplex detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57(2):163-7.

CRYPTOSPORIDIUM TÜRLERİ

Dr. Hüseyin CAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir

Cryptosporidium türleri, insan ve hayvanlarda gastrointestinal sistem ve solunum yollarında yerleşen, *Apicomplexa* şubesinde yer alan hücre içi parazitlerdendir. *Cryptosporidium*'lar insanlar, çiftlik hayvanları, kuşlar, sürüngenler, balıklar gibi pek çok hayvan türünü enfekte edebilmektedir (1-4). Klinik bulgular konağın yaşı, genel sağlık durumu ve alınan parazit sayısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kriptosporidiozis sırasında hastada uzun süre seyreden ishal atakları oluşabilir, immün sistemi baskılanmış kişilerde ishal daha da şiddetlenip hastalık yaygınlaşabilmektedir. Enfeksiyon sırasında *Cryptosporidium* ookistlerinin yoğunluğu hastalığın şiddeti ile paralel değişim göstermektedir. Bu sebeple hastalara ait örneklerde parazit yükünün belirlenmesinin önemli olduğu belirtilmektedir (2,5 6).

Cryptosporidium ile bulaş sporozoit içeren ookistlerin, su veya yiyeceklerle ağız yoluyla alınması sonucunda meydana gelmektedir. Bazı ookistler konağı tekrar enfekte edebilirken, diğerleri dışkı yoluyla vücuttan atılmaktadır. *Cryptosporidium* lar insandan insana, insandan hayvana, hayvandan insana ve hayvandan hayvana bulaşabilmektedir (5,7-9). Kriptosporidiozis prevalansı özellikle su parklarında, nehir, göl ve yüzme havuzlarının kullanımının arttığı yaz aylarında artış göstermektedir (10).

Cryptosporidium tanısı dışkı, balgam ve safra örneklerinde çeşitli yöntemlerden yararlanılarak yapılır. Bunlar mikroskopi, kültür, antijen arama, akım sitometrisi, konsantrasyon yöntemleri ve nükleik asit saptama teknikleri olarak belirtilmektedir (6,11,12). Çeşitli örneklerdeki ookistler geleneksel etil-asetat ve yüzdürme yöntemleri ile yoğunlaştırılabilir. *Cryptosporidium* ookistlerinin saptanmasında özel boyalar kullanılmaktadır. Modifiye edilmiş Ziehl-Neelsen aside dirençli boyama yöntemi düşük maliyeti, kullanım kolaylığı, özel mikroskoba gerek duyulmaması ve aynı preparatta diğer patojenlerin araştırılmasına olanak vermesi nedeniyle en sık kullanılan yöntem olarak gösterilmektedir (6,11). Son yıllarda *Cryptosporidium*'ların tanısı immüno Floresans yöntemi ile yapılmakta, immüno manyetik yakalama yöntemi ile birleştirildiğinde duyarlılığının arttığı bildirilmektedir (13,14).

Cryptosporidium'un moleküler tanısı ve tür ayırımında, hedef olarak çok çeşitli genler tercih edilmektedir. Bunlar içinde, ookist duvar proteini (COWP) ve *small-subunit* rRNA genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniklerinde en çok hedef alınan bölgelerdir (15,16). Moleküler çalışmalarda, dışkı örneklerinde bulunan bazı maddelerin PCR reaksiyonlarında inhibitör etki oluşturmasının önemli bir sorun olduğu bilinmektedir. Bunun için kulla-

nılan immüno manyetik ayırma (IMS), akım sitometrisi ve sakroz flotasyon yöntemleri ile yapılan DNA ekstraksiyonlarında hem inhibitör etki azalmakta hem de daha özgül olarak ookist toplanmaktadır (6,17). Ayrıca moleküler yöntemlerden yararlanılarak *Cryptosporidium* un zoonotik yolla bulaşıp bulaşmadığının anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedildiği bildirilmektedir (18-20). Hem klinik hem de çevreden alınan örneklerde PCR çalışmalarının, diğer mikroskobik yöntemlerden daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir (6,16,17).

Son yıllarda geliştirilen gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün diğer PCR yöntemleri ile aynı olması ve bu işlemlerin çok kısa bir sürede gerçekleşmesi açısından oldukça önemlidir. Özellikle kriptosporidiozisin epidemiyolojik çalışmalarında, su kaynaklı büyük salgınlarda ve immün sistemi baskılanmış hastaların erken tanısında PCR alternatif olarak hızlı ve güvenilir bir moleküler yöntemdir (6,17,21-23).

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji laboratuvarında Rt-PCR ile *Cryptosporidium* spp. rutin moleküler tanısında *oocyst wall protein* (COWP) geni hedef bölge olarak kullanılmaktadır (GenBank no: AF248743.1) (24). DNA örneğinden 151 bp büyüklüğündeki DNA parçası COWP-P702F (5'-CAAATTGATACCGTTTGTCTTCTG-3') ile COWP-P702R (5'-GGCATGTTCGATTCTAATTCAGCT-3') primerleri ve COWP-P702 hidroliz probu (FAM-5'-TGCCATACATTGTTGTCTGACAAATTGAAT-3'-BHQ) kullanılarak Rt-PCR ile tanımlanmaktadır. Rt-PCR ile hidroliz probu kullanılarak tek basamakta ve yaklaşık 40 dakikalık bir süre içinde bu gen bölgesinin amplifikasyonu sağlanmaktadır.

Kaynaklar

1. Tzipori S. Cryptosporidiosis in perspective. *Adv Parasitol* 1998; 27: 63-130.
2. Tzipori S, Griffiths JK. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol* 1998;40: 5-36.
3. Mosier DA, Oberst RD. Cryptosporidiosis. A global challenge. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 102-11.
4. Tzipori S, Widmer G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitol* 2008; 24: 184-9.
5. Fayer R. Biology, pp: 1-41. In: Fayer R, Xiao L (eds), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2008, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
6. Üner A, Tanrıverdi S, Caner A, Değirmenci A. *Cryptosporidium*'larda moleküler biyolojik yapı ve çalışmalar. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H (ed), *Moleküler Parazitoloji*. 2009, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
7. Borowski H, Clode PL, Thompson RC. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol* 2008; 24(11):509-16.

8. Caccio SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4: 429–43.
9. Tzipori S, Buck GA. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 2004; 431: 1107–12.
10. Yoder JS, Herral C, Beach MJ; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cryptosporidiosis surveillance - United States, 2006–2008. *MMWR Surveill Summ* 2010;59(6):1–14.
11. Arrowood MJ. Diagnosis, pp: 43–64. In: Fayer R (eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 1997.CRC Press, Boca Raton, FL.
12. Döşkaya M, Dayangaç N, Kuman A. *Cryptosporidium parvum*. *Turkiye Parazitol Derg* 2003; 27: 64–70.
13. Deng MQ, Cliver DO, Mariam TW. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *App Environ Microbiol* 1997; 63: 3134–8.
14. Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 274–9.
15. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect* 2004; 6: 773–85.
16. Can H, Caner A, Döşkaya M, et al. Demonstration of *Cryptosporidium parvum* in immune suppressed rats using nested PCR. *Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37(3):165–8.
17. Ramirez NE, Sreevatsan S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Vet Parasitol* 2006; 136: 201–13.
18. Hunter PR, Hadfield SJ, Wilkinson D, Lake IR, Harrison FC, Chalmers RM. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 82–8.
19. Learmonth JJ, Ionas G, Ebbett KA, Kwan ES. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zeland. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3973–8.
20. Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2006; 44:4303–8.
21. Amar C, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. Extraction and genotyping of *Cryptosporidium parvum* DNA from fecal smears on glass slides stained conventionally for direct microscope examination. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 401–3.
22. Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2335–8.
23. Tanrıverdi S, Tanyeli A, Baslamisli F, et al. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3237–44.
24. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, et al. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(2):332–7.

STRONGYLOIDES STERCORALIS

Bio. Esra ATALAY

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Son yıllarda kanser, kortikosteroid tedavisi ve organ transplantasyonu tedavilerinde immün sistemi baskılayan ilaçların kullanımındaki artışa bağlı olarak fırsatçı parazitlerin oluşturduğu enfeksiyonların sıklığı da artmaktadır. Ayrıca bunun yanında AIDS gibi immün sistem yetmezliği olan hastalarda da parazitik hastalıkların arttığı gözlemlenmiştir (1-5). Bu fırsatçı parazitler arasında yer alan *Strongyloides stercoralis*; immün sistemi baskılanmış veya immün yetmezliği olan hastalarda ciddi, yaygın enfeksiyonların oluşmasına neden olmaktadır (6).

Strongyloides stercoralis enfektif larvaları; kedi, köpek veya insan gibi canlıların derisinden girerek kan dolaşımına katılır ve buradan ince bağırsağa yerleşerek erişkin dişi oluşturur. Oluşturduğu enfeksiyon çoğunlukla asemptomatik ilerler. İmmün sistemi yetersiz ya da baskılanmış olan hastalarda ise otoenfeksiyon, hiperenfeksiyon veya yaygın strongiloidozise neden olarak %80 oranında mortaliteyle sonuçlanır (7).

S.stercoralis'in tanısı, karakteristik enfektif larvaların dışkıda mikroskopik yöntemler kullanılarak direkt incelenmesiyle ya da agar plak kültüründe gösterilmesiyle yapılır. Ancak larvaların gözlemlenebilmesi için şiddetli diyare durumunun olması gerekir. Bu nedenle mikroskopik inceleme yönteminin duyarlılığı düşüktür. Agar plak kültürü ise duyarlılığı %100'e ulaşan yöntemlerden biridir; ancak en iyi sonuç için yedi günlük kültür takibi gerekmektedir. Hastalığın tanısında kullanılan serolojik testler ise, immün sistemi yetersiz/baskılanmış olan hastalarda antikor yanıtlarındaki düşmeye bağlı olarak çapraz reaksiyonlar ya da yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir (7). Bu nedenle asemptomatik ilerleyen, immün sistemi baskılanmış ya da immün yetmezliği olan hastalarda erken tanı için moleküler yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ön plana çıkmaktadır.

Son yıllarda sıklıkla kullanılan gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) yöntemi ise, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile immün sistemi baskılanmış ya da immün yetmezliği olan hastalarda hızlı ve erken tanı için en etkin yöntem olarak kabul edilmektedir (7,8). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji laboratuvarında *S.stercoralis*'e ait 18S rRNA (GENBANK No: AF279916) geninin 101 bp'lik kısmı Rt-PCR yöntemi ile önceden tarif edildiği şekilde çoğaltılmaktadır (8,9). Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu, zirkonya ve cam tanecikleri kullanılarak modifiye yöntemle yapılmakta ve örneklerde *S.stercoralis*

18S rRNA geni 5'-GAATTC AAGTAAACGTAAGTCAT-TAGC-3' (28 nt, Stro18S-1530F) ve 5'-TGCCTCTGGA-TATTGCTCAGTTC-3' (23 nt, Stro18S-1630R) primerleri ile FAM-5'-ACACACCGGCCGCTCGCTGC-3'-BHQ (25 nt, Stro18S-1586P) hidroliz probu kullanılarak Rt-PCR ile araştırılmaktadır. Reaksiyonda negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak ise strongiloidozisli hastadan elde edilen DNA örneği ve ayrıca 111 bp'lik sentetik DNA ürünü kullanılmaktadır.

Günümüzde immün sistemi baskılanmış ya da immün yetmezliği olan hastaların fırsatçı parazitlerle enfeksiyonlarında, tanı için duyarlılığı yüksek olan yöntemlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu hastalarda özellikle erken tanı ve duyarlılıkta karşılaşılan problemler oldukça fazladır. Anabilim Dalımızda yapılan çalışmada, immün sistemi yetersiz/baskılanmış olan hastalarda ciddi klinik tablolara yol açan *S.stercoralis*'in erken tanısının, yüksek duyarlılık sağlayan Rt-PCR yöntemiyle gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir.

Kaynaklar

1. 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(10):1526-32.
2. Özcel MA. İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları. 1995. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 12, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
3. Nissapatorn V, Sawangjaroen N. Parasitic infections in HIV infected individuals: diagnostic & therapeutic challenges. *Indian J Med Res* 2011; 134(6):878-97.
4. Caner A, Dönmez A, Döşkaya M, et al. Determining Toxoplasma high-risk autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients by systematic pre-transplant PCR screening of stem cell originated buffy coat. *Parasitol Int* 2012; 61(4):565-71.
5. Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR. Infections of *Blastocystis hominis* and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106(4):267-9.
6. Incani RN, Hernández M, González ME. Hyperinfection by *Strongyloides stercoralis* probably associated with rituximab in a patient with mantle cell lymphoma and hyper eosinophilia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010; 52(4):221-4.
7. Repetto SA, Soto CD, Cazorla SI, et al. An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. *Acta Trop* 2013; 126(2):110-4.
8. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, et al. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(2):332-7.
9. Verweij JJ, Canales M, Polman K, et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(4):342-6.

TANISAL MİKROBİYOLOJİDE HIZLI/HASTA BAŞI TESTLERİN KULLANIMI VE DEĞERİ

Prof. Dr. Selda ERENŞOY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Enfeksiyon hastalıklarında hastanın etkin yönetimi ve salgınların kontrolü için mikrobiyal ajanın hızlı ve doğru tanımlanması esastır. Mikrobiyolojide tanıya yönelik teknolojilerde büyük gelişmeler sağlanmıştır. Ancak, laboratuvar tanının yerinde ve doğru kullanımının yaygınlaştırılması için çaba gerekmektedir. Bu konuda, laboratuvarlar kadar klinisyenler ve endüstrinin de teşvik edilmesi önemlidir. Laboratuvarlarda sonucu alınmayan birçok test bulunmaktadır. Hızlı sonuç verme 1-2 saat içinde gerçekleştiğinde laboratuvar tanının kullanımı da artmaktadır. Hastaların kolay örnek vermesi ve örneğin ulaştırılmasının kolay olması da aynı derecede önemlidir. Öncelikle gereksinimin ve mevcut durumun saptanması, buna göre strateji geliştirilmesi gereklidir. Bu testlerin doğruluğu, duyarlılığı ve özgüllüğü güvenilir olmalıdır. Prevalansa göre pozitif ve negatif prediktif değerler değişeceği için testin uygulanacağı popülasyonun özelliği dikkate alınmalıdır.

Hızlı/hasta başı testler; a) geç veya yanlış tanının maliyetinin yüksek olduğu, b) yanlış tedavinin hastaya zarar verdiği, c) uygulanmakta olan klinik örnek toplama şeklinin riskli olduğu, d) kullanılmakta olan yöntemin pahalı veya özel koşullar gerektirdiği, e) kullanılmakta olan testin duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olduğu, f) gereksiz tedavi olasılığının yüksek olduğu, g) tanı konmadığı zaman toplum sağlığının riske girdiği ve h) erken tanının korunmada önemli rol oynayabileceği durumlarda anlamlıdır; kullanımının ve geliştirilmesinin artırılmasına çalışılmalıdır.

Kapsam ve tanımlar

- ✓ Hızlı testler: Hastanın yönetimine karar verilmesi için 1-2 saat içinde sonuç verilmesi.
- ✓ Hasta başı testler (HBT): Hastanın bulunduğu ortamda, hasta ayrılmadan testin yapılması ve sonuçlandırılması.
- ✓ Basit testler: Testin uygulanması için komplike işlemlerin ve özelleşmiş personelin gerekmemesi; kullanılan reaktiflerin saklanma koşullarının kolay karşılanabilmesi (sıcağa dayanıklı); raf ömrünün uzun olması işlemleri kolaylaştırır.
- ✓ Örnekler: Örnek alınımının kolay olması; invazif işlemlerin gerekmemesi (ağız sürüntüsü, tükürük, idrar gibi).

Hızlı/HBT'in gereksinim durumları

- Klinik örneklerden hızlı tanı (HBV, HCV, HIV, HSV-1/2, VZV, enterovirus, parechovirus, influenza, RSV, *Streptococcus pyogenes*, EBV gibi)

- Klinik izolatin hızlı tanımlanması (bakteri, virus, mantar, mikobakteri ayrımı gibi)
- Hasta başında tanı (solunum yolu enfeksiyonları - bakteri/virus ayrımı, menenjit gibi)
- Sendromik test (sepsis, pnömoni, menejit, ishal gibi)
- Enfeksiyonun ayırt edilmesi (enfeksiyon varlığı, bakteriyel/viral ayrımı gibi)
- Kaynakların sınırlı olduğu ortamlar (HIV, tüberküloz, sıtmanın yaygın olduğu toplumlar)
- Ulaşılması zor topluluklar (HIV enfeksiyonu gibi)
- Enfeksiyon kontrolü (hastane enfeksiyonları, salgın değerlendirmeleri, çoklu ilaç direncinin araştırılması gibi)
- Yeni patojenlerin tanımlanması (MERS CoV, influenza H5N7 gibi)

Hızlı/HBT için kullanılabilir yöntemler ve yeni teknolojiler

- Antijen, antikor testleri (membran ELISA, lateral akım)
- Tek basamaklı kartuşlu moleküler testler
- Çoklu (multipleks) tek basamaklı kartuşlu moleküler testler
- Mikro-yongalar
- Biyosensörler
- MALDI-TOF MS (matris üzerinden lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuşma zamanı kütle spektrometresi), ESI-TOF (iyonların elektro-saçılma zamanı)
- Taşınabilir küçük cihazlar üzerinde moleküler testler (LAMP)
- Mikro-elektro-mekanik sistemler, optik sistemler, vb.

Bu oturumda; hızlı/HBT'in kapsamı, uygulama örnekleri, etkin kullanımı, maliyet etkinliği ve yeni teknolojik uygulamalar ile gelecekteki durum tartışılacaktır. Tartışmalar, kolaylaştırıcıların yönlendirmeleri ile katılımcılarla birlikte sürdürülecektir.

Oturum planı

- Hızlı/HBT'in ihtiyaç nedenleri
- Bakteriyolojide hızlı/HBT'in uygulamaya girmesi ve örnekler
- Virolojide hızlı/HBT'in uygulamaya girmesi ve örnekler
- Nükleik asit testleri hasta başı olabilir mi? Yeni teknolojik uygulamalarla gelecek
- Hızlı/HBT'de kalite güvencesinin sağlanması
- Avantaj ve dezavantajların özeti - Çözüm önerileri

Kalite güvencesinin sağlanması

- Hasta başı testlerde kalite kontrolü çok kritiktir ve testin kendisi gibi kalite kontrolü de aynı anda yapılmalıdır. Kalite kontrolü sistemin içine entegre edilmeli, hatalı sonuçlar ve sorunlar bildirilmelidir.
- Reaktiflerin geçerliliği, örneğin kalitesi ve miktarı kontrol edilmelidir. İnsana bağlı hatalar kaçınılmaz olduğundan, test basamakları olabildiğince basit olmalıdır. İç kontroller kadar dış kontrollerin kullanımı da gözetilmelidir.
- Kalite kontrol basamaklarından hiçbirinin atlanması için önlem alınmalı, aksi durumda sistem sinyal vermelidir.
- Testin maliyeti hesaplanırken (maddi ve zaman açısından) kalite kontrol dahil edilmelidir.
- Testin uygulanması için gerekli eğitim materyali çok iyi ve pratik olarak tasarlanmalıdır. Uygulanabilirliği test edilmelidir.
- Güvenlik eğitimine özen gösterilmelidir. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanmasında danışmanlık sağlanmalı ve garanti edilmelidir.

Kaynaklar

- American Academy of Microbiology. Bringing the lab to the patient. Developing point-of-care diagnostics for resource limited settings. 2012, American Society for Microbiology, Washington, DC. <http://academy.asm.org/images/stories/documents/pointofcarediagnostics.pdf>
- Banoo S, Bell D, Bossuyt P, et al; TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel (WHO/TDR) 2006. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(9 Suppl):S21-31.
- Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2013; 57(Suppl 3):S139-70.
- Foudeh AM, Didar TF, Veres T, Tabrizian M. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics. *Lab Chip* 2012; 12:3249-66.
- Pai NP, Vadnais C, Denking C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLOS Med* 2012; 9:1-7.
- Park S, Zhang Y, Lin S, Wang TH, Yang S. Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnol Adv* 2011; 29:830-9.
- Peeling RW, Mabey D. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:1062-9.
- Roskos K, Hickerson AI, Lu HW, et al. Simple system for isothermal DNA amplification coupled to lateral flow detection. *PLoS One* 2013; 8(7):e69355.
- St John A, Price CP. Economic evidence and point-of-care testing. *Clin Biochem Rev* 2013; 34:61-74.
- Zhu H, Isikman SO, Mudanyali O, Greenbaum A, Ozcan A. Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics. *Lab Chip* 2013; 13:51-67.

HIZLI/HASTA BAŞI TESTLERİN VİROLOJİDE KULLANIMI

Prof. Dr. Rüçhan YAZAN SERTÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Virus hastalıkları, önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır. Hızlı ve doğru tanı, hastalığın tedavisinin erken başlatılması veya ampirik tedavinin doğru yönlendirilmesi, salgınlar ve biyolojik saldırılar açısından önlemlerin hızla alınması, gereksiz testlerin yapılmasının önlenmesi ve antiviral kullanımının ve gereksiz hastane yatışlarının azalması açısından çok önemlidir. Gelişen teknolojinin de desteğiyle, son yıllarda viral hastalıklarının hızlı tanısı için çok sayıda ve farklı teknolojilerde hızlı/hasta başı testler (HHBT) kullanıma girmiştir ve girmeye devam edecektir.

Viral hastalıklarının hızlı tanısında virusa ait antijenler, özgül antikorlar ya da virusun moleküler yapısı araştırılabilmektedir. Virusları saptamada kullanılan, üzerinde çalışılan ve kullanılabilecek olan olası pekçok teknoloji vardır. Membran EIA, lateral akım, tek basamaklı moleküler testler, mikro-yongalar, nanoteknoloji ve biyosensörler, MALDI-TOF ve LAMP bunlardan bazılarıdır. Mevcut teknolojilerin HHBT'lere uyarlanabilmesi ve yeni teknolojilerle gelecekte aynı anda birkaç virüsü saptayabilecek panel testler HHBT'ler içinde yerini alabilecektir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ideal bir tanı testinin; ekonomik, duyarlı, özgül, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, mümkünse minimal ekipman gereksinimi gösteren ve son kullanıcıya ulaştırılabilir olması gerektiğini vurgular (AS-SURED). Ayrıca ideal bir HHBT'nin hızlı sonuç verebildiği gibi, doğruluk oranı yüksek, tekrarlanabilir, kullanım ve yorumu kolay, depolanması kolay, saklanma süresi uzun ve ortam şartlarından mümkün olduğunca etkilenmeyen ve maliyet etkin olması istenir. Bunların hepsi aslında ideal bir HHBT'yi de açıklar.

Mevcut HHBT'ler maliyet etkinlik açısından değerlendirildiğinde tanı masraflarını %2 artırırken, tedavi

kararında %60-70 etkili olduğu anlaşılmaktadır. Maliyeti azaltmak için ayrıca sendromik yaklaşım yerine uygun seçilmiş HHBT'ler kullanılabilir.

Testlerin laboratuvar enformasyon sistemlerinde izlenebilirliği, kayıtların kontrolü ve kalite kontrol önemlidir. Bu nedenle klinik mikrobiyoloğun ve laboratuvarın denetimi altında olmalıdır.

Ülkeler, kullanıma giren HHBT'ler ve teknolojilerini dinamik bir şekilde değerlendirerek imkanları ve hastalıkların görülme sıklıkları ile ilişkili olarak tanı ve doğrulama algoritmalarını belirlemelidir. Günümüzde rotavirus, adenovirus, HBV, HCV, HIV, HSV-1/2, VZV, enterovirus, parechovirus, influenza, RSV ve EBV gibi pekçok virus için HHBT'ler bulunmaktadır. Bu test grubu ayrıca burun, nazofarengeal ve boğaz sürüntüsü, balgam, idrar, dışkı ve kan örneği gibi farklı klinik örneklerden çalışılmaya imkan sağlamaktadır.

Bu bölümde farklı viruslar, farklı klinik örnekler, mevcut uygulamalar ve gelecek interaktif olarak tartışılacaktır.

Kaynaklar

1. St John A, Price CP. Economic evidence and point-of-care testing. Clin Biochem Rev 2013; 34:61-74.
2. Pai NP, Vadnais C, Denkinge C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. PLOS Med 2012; 9:1-7.
3. Peeling RW, Mabey D. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1062-9.
4. Clerc O, Greub G. Routine use of point of care tests: usefulness and application in clinical microbiology. CMI 2010; 16:1054-61.
5. Ramana KV. Molecular diagnostic methods and their application to patient care: Clinical Microbiologist's perspective. Am J Clin Med Res 2014; 2:8-13.

HIZLI/HASTA BAŞI TESTLERE İHTİYAÇ NEDENLERİ VE BAKTERİYOLOJİDE UYGULAMALAR

Doç. Dr. Abdullah KILIÇ

GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tıp alanında son yıllardaki önemli ilerlemelere rağmen, enfeksiyon hastalıkları, yıllık tahmini 15 milyonun üzerinde ölüm nedeniyle hala önemini korumaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde çocuk ve genç ölümlerinin en önemli nedenlerinden birisi enfeksiyon hastalıklarıdır. Bu bölgelerdeki hastaların çoğu laboratuvar testi yapılmadan enfeksiyonun semptomlarına göre tedavi edilmektedir. Kırsal bölgelerde hastalar saatlerce yürüyerek kliniklere ulaşmaktadır. Test yapıldıktan sonra sonuçlar bir gün veya bir hafta sonra sonuçlanmakta, fakat hastaların birçoğu test sonuçları için geri dönmemektedirler. Bu bölgelerde hızlı/hasta başı testler (HBT) büyük önem taşımaktadır. Hızlı tanı testlerinin yetersizliğinden dolayı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) özellikle gelişmekte olan ülkelerde kırsal bölgelerde yaşayan hastalar için sendromik yaklaşımına göre tedavi önermektedir. Örneğin ateş, öksürük ve hızlı nefes alma şikayetleri olan çocuklara bakteriyel pnömoni tanısı konularak herhangi bir test yapılmadan antibiyotik tedavisi verilmektedir (1).

Enfeksiyon hastalıklarının, mikroorganizmaların doğası, yayılma özelliği ve hayatı tehdit eden konak reaksiyonundan dolayı kronik hastalıklar ve çoğu genetik hastalıklardan açık olarak ayrılması gerekmektedir. Hastaya hızlı olarak müdahale edebilmek için, ilk kritik birkaç saat içinde mikroorganizmayı tanımlamak, antibiyotik duyarlılık profili veya toksin üretim profilini uygun tedavi seçimi için tanımlanmak ve kişisel tedavi seçimi açısından ilaç metabolizması ve enfeksiyona duyarlılığı test etmek gerekmektedir. Sepsis gibi hayatı tehdit eden hastalıklarda uygun müdahale için kritik süre altı saattir. Septik şok aşamasının ilk altı saati içerisinde antibiyotik tedavisinin gecikmesi hastanın yaşama oranını her saat için %7.6 oranında düşürmektedir. Hızlı tanı ile hastanın hastanede yattığı süresi azalacak ve buna bağlı olarak da hasta maliyetleri önemli oranda düşecektir (2).

Hasta başı testleri “test sonuçlarını hastayı takip eden kişiye hemen veya kısa süre içinde vermek için hasta yakınında yapılan testler” olarak tanımlanmaktadır (3). Bu tanım son dönemlerde biraz daha genişletilerek “hastanın durumunu direkt olarak etkilemediği zaman bile merkezi laboratuvar çevresi dışında (ev testlerini içerir) hızlı olarak yapılan testler” olarak tanımlanmıştır (4).

Hasta başı testlerinin ideal karakteristik özellikleri, reaktiflerin kullanıma hazır olması, nerede kullanılırsa kullanılsın hatasız sonuç vermesi, testlerde kullanılan solüsyonların uzun süre oda ısısında saklanabilir olması, taşınabilir olması, testin yapılması için minimum teknik yetenek gerektirmemesi, testin hızlı, duyarlı ve özgül sonuçlar vermesi, test kapasitesinin talebe göre olması, az yer

kaplaması, düşük maliyetli veya hasta bakımı için fiyat etkinliğinin düşük olması ve geniş bir klinik örnek çalışma aralığının olmasıdır. Klinik Laboratuvarları İyileştirme Düzeltme Kuruluşu [Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)], hasta başı testlerini kompleks olmayan, orta derece kompleks ve ileri kompleks olarak üç gruba ayırmıştır. HBT'lerin hemen hemen hepsi ilk gruba girmektedir. Bu testlerin listesi CLIA internet sayfasında yayımlanmaktadır (<http://www.cms.hhs.gov/CLIA/downloads/waivetbl.pdf>) (5). Ayrıca HBT'ler, ucuz ve ekipman gerektirmeyenler birinci nesil, kart temelli NAAT gibi teknolojileri kullanan ikinci nesil ve cep telefonları gibi elde taşınan cihazların kullanılması ile yapılan üçüncü nesil olarak sınıflandırılmaktadır. Yeni nesil testler diğerleri ile karşılaştırıldığında hem pahalıdır hem de ekipman gerektirmektedir (6).

Gelişmiş ülkelerde sağlık hizmetlerinde kullanılan testler merkezi laboratuvar veya komiteler tarafından koordine edilmektedir. Test ulaşıktan bir iki saat içinde sonucunun verilmesi uygun olarak görülmektedir (5). Çoğu HBT'ler bu zaman dilimi içinde sonuç verebilmektedir (4). HBT'ler ameliyathane, yoğun bakım üniteleri, acil bölümler, özel ayaktan hasta klinikleri, merkezi laboratuvarı olmayan hastanelerde ve bazı hastanelerde laboratuvar çalışma saati dışındaki zamanlarda kullanılmaktadırlar. Hastane dışında ise tıbbi uygulamalar, ev ziyaretleri, acil durumlar ve hastane dışı yaşlı bakım durumlarında kullanılmaktadır. Ayrıca askeri, sivil savunma ve spor hekimliği gibi özel alanlarda da kullanılmaktadır (7). Bu amaçla acil merkezlerine yakın olarak konuşlandırılmış ve 7/24 çalışan laboratuvarlar mevcuttur (4).

Mikroskopi ve Gram boyama enfeksiyon hastalıklarının tanısı için seçilecek ilk tanısal yöntemdir ve hala etkin olarak kullanılmaktadır. Ayrıca özgül immünolojik ve peptid nükleik asit problemler, mikroskobik temelli tanı sistemlerinde kullanılmaktadır. Bakteriyel kültür veya hücre kültürü yöntemleri tanıda kullanılmakta, üreyen mikroorganizmadan duyarlılık testi yapılmakta ve sonuç verilmektedir (5). Ancak pahalı olması, uzun zaman gerektirmesi ve taşınma esnasında örnekteki mikroorganizma canlılığının korunmasında sorunlar olması, sürekli elektrik kaynağı ve reaktif gerektirmesi ve deneyimli teknisyen gerektirmesinden dolayı hasta başı testi olarak tercih edilmemektedir. Son yıllarda antijen ve antikor tespit eden enzim temelli immünolojik yöntemler (EIA) geliştirilmiştir. Bu yöntemler nispeten basit ekipmanlar ile orta düzey laboratuvarlarda ve özel örnek transport durumu gerektirmeden yapılabilmektedir (8). HBT olarak en sık lateral akım immünokromatografik testler (İKT) geliştirilmiş ve

kullanılmaktadır. Bu yöntemde, plastik veya kartondan yapılmış bir kaset alanına yerleştirilmiş, mikroorganizma partikülleri veya antijenleri içeren nitrosellüloz membran vardır. Sıvı hasta örneği nitrosellüloz membran ile ilişkili kuru alana damlatılmakta ve 10-15 dakika içinde renk değişikliği göz ile görülebilmektedir. Bu testlerdeki en önemli sorun sonuçların değerlendirilmesidir (2). Bu testler istenildiği zaman hemen uygulanabilmekte, hızlı sonuç vermekte, minimum hazırlama zamanı ve tecrübe gerektirmektedir. Ancak bu tür testlerin çoğunun kapasitesi düşüktür ve sadece bir testin yapılmasına olanak sağlamaktadır (5).

Duyarlılığı ve özgüllüğü artırmak için nükleik asit amplifikasyon teknolojisi temelli (NAAT) testler geliştirilmiştir. Bu testlerde nükleik asit ekstraksiyonu ve amplifikasyon basamaklarının, hem kontaminasyonun önlenmesi hem de iş yükünün azaltılması için kullanıcı müdahalesi dışında yapılması tercih edilmektedir (8). Cepheid GeneXpert (Sunnyvale, CA, ABD) market lideri olarak görülmektedir. İnfluenza, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium difficile* için kullanılan sistemleri vardır. Rifampisin direnci ile birlikte *Mycobacterium tuberculosis*'i tespit eden GeneXpert sistemi, DSÖ tarafından kaynağı fakir bölgeler için tavsiye edilen ilk HBT'dir (4). Nanoteknoloji HBT'leri son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Nanopartiküllerin kullanıldığı nükleik asit temelli FDA onayı almış Verigene (Nanosphere, <http://www.nanosphere.us>) bu sisteme verilecek örneklerden biridir (2). Son dönemlerde, silikondan yapılmış mikroçipler ile kontrol edilen cep telefonları ve kişisel bilgisayarlar için geliştirilmiş nanoteknoloji temelli mikroelettronik sistemler geliştirilmiştir (8).

Günümüzde etkene veya sendroma yönelik testler bulunmaktadır. Piyasada bakteriyel vajinozis, *Borrelia burgdorferi*, *Candida vulvovajiniti*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium parvum*, ishali hastalıklar, *Entamoeba histolytica/dispar*, lenfatik filariasis, *Giardia intestinalis*, insan immün yetmezlik virusu (HIV), insan papillomavirus (HPV), *Helicobacter pylori*, influenza A/B virus, alt solunum yolu enfeksiyonları, malaria, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum* ve *Trichomonas vaginalis* için testler mevcuttur (2).

A grubu streptokoklar için HBT'ler

Tonsillofarenjit, aile hekimleri ve çocuk hastalıkları uzmanlarının ayaktan muayene ettikleri hasta grubunun başında gelmektedir. Çoğu olguların nedeni viral etkenlerdir. A grubu beta hemolitik streptokoklar (AGBHS) akut bakteriyel tonsillofarenjitin en önemli etkenidir ve erişkin olgularının %5-10'undan, pediatrik olguların ise %30'undan sorumludur. Tanıda Centor klinik skorlaması, muhtemel streptokok enfeksiyonunun tahmininde kullanılmaya rağmen klinik skorlama viral ve bakteriyel enfeksiyonu ayırt edemediğinden mikrobiyolojik yöntemlere gerek duyulmaktadır. Altın standart kanlı agara yapılan boğaz kültürüdür. 1980 yılından beri çeşitli hızlı testler *Streptococcus pyogenes*'in hücre duvar yapısındaki Grup A karbohidrat antijenini (C-antijen) tespit et-

mek için geliştirilmiştir. İlk olarak aglütinasyon yöntemi kullanılmasına rağmen, yerini EIA ve sonunda İKT'lere bırakmıştır. Yapılış şekli olarak nispeten basit olmasına rağmen, duyarlılığı, yapan kişinin deneyimi ile ilişkilidir (9). Kültür ile karşılaştırıldığında özgüllüğü %95'in üzerindedir. Bu durum, yanlış pozitif test sonuçlarının nadir olabileceğini ve kültür yapmadan antibiyotik tedavisine başlanabileceğini göstermektedir. Testlerin duyarlılıkları ise %90 civarında değişmektedir. Bu durum da, yanlış negatif sonuçların özellikle çocuklarda kültür ile doğrulanması gerektiğini göstermektedir (10).

B grubu streptokoklar için HBT'ler

B grubu streptokok (BGS), *Streptococcus agalactiae*, annenin rektal ve/veya vajinal bölgesinde kolonize olarak vertikal geçiş ile yenidoğanlarda önemli mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Erken başlayan yenidoğan hastalığı her 2000 doğumun 1 veya 2'sinde görülmekte ve intrapartum antibiyotik tedavisi ile önlenmektedir (11). Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) hamileliğin son periyodunda (35-37 hafta) sistematik olarak tarama yapılmasını önermektedir (9). Altın standart yöntem, alınan örneğin selektif besiyerinde inkübe edilmesi ve kanlı agara pasajının yapılmasıdır. Bu yöntemin duyarlılığı %54-87 arasında değişmekte ve 36-72 saatte sonuç alınmaktadır (12). Geliştirilen hızlı testler arasında ise; gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR), EIA, optikal immünolojik yöntem (OIA), DNA hibridizasyon ve lateks aglütinasyonu sayılabilir. Bunların içinde özellikle Rt-PCR ve OIA yöntemlerin yenidoğan erken başlangıçlı hastalık riskini azaltacak antibiyotik ihtiyacını tespit eden hızlı test özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Rt-PCR'ın OIA'ye göre doğruluğunun daha yüksek olduğu görülmüştür (11). Rt-PCR yöntemi olarak şu an kullanılan Xpert BGS (Cepheid) yöntemidir. Japonya'da araştırmacılar yeni BGS için yüzey immünojenik proteini tespit eden immünokromatografik test geliştirmişlerdir. Bu testin duyarlılığının %93.1, özgüllüğünün ise %99.6 olduğu bildirilmektedir (13).

Streptococcus pneumoniae için idrar antijen testi

Toplum kaynaklı pnömoniler (TKP), tüm dünyada önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında yer alır. Akılcı antibiyotik kullanımı, etken patojene uygun tedavi veya dar empirik tedavi yaklaşımı maliyeti, ilacın muhtemel yan etkilerini ve direnç gelişme tehdidini azaltacaktır. Uygun ve iyi kalitede balgam almanın zor olması, kan kültürünün duyarlılığının düşük olması, bazı hastaların örnek alım öncesi antibiyotik tedavisi almış olması ve transport zamanının uzun olmasından dolayı, geleneksel kültür yöntemleri ile etkeni tespit etmek güçtür (14). *S.pneumoniae* üremesi için 24-48 saat beklenmesi gerekmektedir ve kan akımı enfeksiyonu olsa bile etken, pnömokokal pnömonili hastaların ancak %40-50'sinin balgam kültüründen izole edilebilmektedir (15). 1999 yılında ABD Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tüm pnömokokların hücre duvar yapısında bulunan C-polisakariti tespit eden 15 dakikada yapılan İKT teste onay vermiştir (9). Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Cemiyeti, antibiyotik duyarlılık testi yapmasa da, klinik ve tıbbi hikayesi yüksek olasılıklı

pnömokokal pnömoni veya şiddetli pnömonisi olan hastalar için önermektedir (16). Testin duyarlılığı kan kültürü ve alt solunum sistemi örneklerinin mikrobiyolojik kültürleri ile araştırılmış ve %66-70 arasında bulunmuş, fakat şiddetli bakteriyemik/pnömonili hastalarda bu oran %80-94'e çıkmıştır (9). Özgüllük oranları %90-100 oranında bildirilmiş olmasına rağmen, özellikle 12 aydan küçük çocuklarda ve taşıyıcılarda oluşan ve *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus oralis* ile *S.pneumoniae* C-polisakkaritinin benzer olmasından dolayı oluşan yalancı pozitiflik önemli sorun oluşturmaktadır (17).

Legionella pneumophila idrar antijen testi

Lejyoner hastalığı, şiddetli TKP ve hastane kaynaklı pnömonilerin en önemli nedenlerinden olup, Kuzey Amerika ve Avrupa'da tüm hastane kaynaklı pnömoni olgularının %1-5'ini oluşturmaktadır (18). Lejyoner hastalığı olan olguların %90'ından fazlasında etken *L.pneumophila*'dır ve %70-80'i daha özgül olarak *L.pneumophila* serogrup 1'dir (19). Zor üreyen mikroorganizma olan *L.pneumophila*'nın kültürü 2-7 gün almakta ve serokonversiyon haftalar içinde oluşmaktadır. Bu nedenle, idrarda *L.pneumophila* hücre duvarı lipopolisakkarit antijenini tespit eden tanı testleri 1970'li yıllarda geliştirilmiştir. Konsantr edilmiş idrar örneklerinde daha iyi sonuç vermektedir. Radyoimmünolojik yöntem, EIA ve İKT kitleri bulunmaktadır. Bunlar içinde İKT hızlı, yapılışı kolay ve ilave cihaz gerektirmemektedir (20). Hızlı test ile olgular erken tespit edilmekte, özellikle salgınlara erken müdahale edilebilmekte ve önlemler erken alınmaktadır. İlave olguların oluşması önlenmekte ve hastalara özgün tedavi uygulanabilmektedir (18). CDC, *Legionella* için idrar testini, yoğun bakımda yatan pnömonili hastalar, immün sistemi baskılanmış hastalar, beta-laktam ve sefalosporin tedavisi etkili olmayan hastalar ve iki hafta içinde seyahat hikayesi olan hastalar için önermektedir (21). 2009 yılında yayınlanan bir meta-analizde, 26 ticari kit ile 14 laboratuvarda yapılmış *Legionella* idrar testi sonuçları değerlendirilmiş; duyarlılık %74, özgüllük ise %99.1 olarak bulunmuş; üriner antijen testlerinin %26 oranında yalancı negatif sonuç verdiği belirtilmiştir (22). İdrar testleri *L.pneumophila* serogrup 1'i tespit ettiğinden, diğer serogrupların neden olduğu enfeksiyonların tanımlanması mümkün olmamaktadır.

Clostridium difficile için hızlı hasta başı testleri

Clostridium difficile, antibiyotik ile ilişkili ishal (Aİİ) ve enterokolitlerin en önemli nedeni olan gram-pozitif, spor oluşturan anaerobik bir bakteridir. *C.difficile*'nin virülansından sorumlu yapılar toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin)'dir. *C.difficile*, hastanede Aİİ gelişen hastaların neredeyse %30'undan sorumludur ve tanı testi yapmadan ampirik tedavi uygulanması doğru değildir. *C.difficile* enfeksiyonunun (CDE) tanısında esas faktör dışkı örneklerinde *C.difficile* toksin A ve/veya B'nin tespit edilmesidir. Tanıda, hücre kültürü sitotoksisite ve toksijenik kültür yöntemleri altın standart kabul edilmektedir. Ancak yöntemlerin yapılması güçtür, zaman alıcıdır ve uzman personel gerektirmektedir. Bu yüzden, çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında daha az zaman gerektiren ve hızlı

olan EIA, İKT ve Rt-PCR yöntemleri kullanılmaktadır (23). EIA yöntemleri referans yöntem ile karşılaştırıldıklarında hızlı, teknik olarak kolay ve düşük maliyetli oldukları için ABD'deki laboratuvarların neredeyse %90'dan fazlası tarafından kullanılmaktadır. EIA tetleri ile birçok çalışma yapılmış ve referans yöntem ile karşılaştırıldığında duyarlılığının düşük ve özgüllüğünün duyarlılığından daha yüksek olduğu görülmüştür. Crobach ve arkadaşları, 13 farklı ticari EIA ile toksin A ve/veya B tespit eden 34 farklı çalışmayı gözden geçirmişler ve testlerin duyarlılıklarının %31-99, özgüllüklerinin ise %65-100 arasında olduğunu bildirmişlerdir (24). Toksin tespitinin yanı sıra, hem toksin oluşturan, hem de oluşturmeyen *C.difficile* izolatları tarafından oluşturulan metabolik bir enzim olan glutamat dehidrojenazı (GDH) tespit eden İKT'ler de vardır. Çoğu laboratuvar, ilk basamağında GDH testi olan iki basamaklı algoritmayı kullanılmaktadır. Bu algorithmada ilk önce GDH testi yapılmakta, eğer negatif ise ileri test yapılmamaktadır. Eğer pozitif ise takibinde toksin testi yapılması gerekmektedir. GDH testi pozitif, toksin testi negatif ise, hasta ya toksijenik olmayan bir *C.difficile* taşımakta ya da toksin testinin yalancı negatif sonuç verdiği düşünülmektedir. Her iki test de pozitif ve hasta da semptomatik ise CDE tanısı konulmaktadır. Şu an piyasada hem GDH, hem de toksini tespit eden ve 30 dakikada sonuç veren C. Diff Quick Chek Complete (Techlab, ABD) kiti mevcuttur. Vasoo ve arkadaşları, 192 dışkı örneği ile yaptıkları çalışmada C. Diff Quick Chek Complete testinin GDH komponentinin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %95.8 ve %89.6, toksin komponentinin duyarlılık ve özgüllüğünü ise sırasıyla %79.2 ve %100 olarak bulmuşlardır (25). NAAT'ler *C.difficile* tanısında son dönemlerde sık olarak kullanılmaya başlanmıştır. Şu anda PCR ve *loop-mediated* izotermal amplifikasyon (LAMP) temelli yöntemler kullanılmaktadır. BD-GeneOhm Cdiff, Prodesse ProGastro Cd, Cepheid GeneXpert *C.difficile* ve illumigene *C.difficile* yöntemleri için FDA onayı mevcuttur. Bunların içinde tek tam otomatize olan Cepheid GeneExpert yöntemidir. Bir silgeç ile alınan dışkı örneği önce tampon içeren şişeye konmakta, vortekslenmekte ve buradan alınarak kartuştaki örnek bölümüne aktarılmaktadır. DNA ekstraksiyonu, PCR ve tespit işlemlerinin hepsi kartuş içinde gerçekleştirilmektedir. Kartuş cihaza koyulduktan yaklaşık 29 dakika sonra sonuçlar elde edilebilmektedir. Yapılan çalışmalar, duyarlılığın %94-100, özgüllüğün ise %93-99 olduğunu göstermektedir (26).

Helicobacter pylori için hızlı hasta başı testleri

Helicobacter pylori gastrit, ülser ve mide kanserini içini alan üst gastrointestinal hastalıklar ile ilişkili olarak bilinmektedir. *H.pylori* prevalansı %10-80 arasında değişmekle birlikte, tüm dünyada çocuk yaş grubunun %50'sini etkilemektedir (27). Tanısında invazif olan ve olmayan çeşitli testler kullanılmaktadır. İnvazif testler kültür, histoloji, hızlı üreaz testi ve PCR'dur. İnvazif olmayanlar ise üre nefes testi, serolojik testler, EIA veya İKT ile dışkıda antijen testleridir. İnvazif testler gastroendoskopi ile yapıldığından invazif olmayan testler daha çok tercih edilmektedir. Serolojik testlerde, *H.pylori*'ye karşı oluşan antikorlar uzun süre kanda bulunduğundan, geçirilmekte

olan ya da önceden geçirilmiş enfeksiyonların ayırımı yapılamamaktadır. Üre nefes testi diğer bir duyarlı ve özgül yöntemdir; ancak pahalıdır, deneyimli personel gerektirir ve kompleks cihazlara ihtiyaç duyar. Bu yüzden dışkı antijen testleri önemli bir alternatif sağlamaktadır. Bu testlerin en önemli avantajları hızlı olmaları ve maliyetinin özellikle üre nefes testiyle kıyaslandığında ucuz olmasıdır. Ayrıca ilave pahalı bir ekipman gerektirmediklerinden her laboratuvar yapılabilmektedir. Özellikle İKT, laboratuvar dışında ofis ortamında dakikalar içinde yapılabilmektedir (28). Bu testlerde kullanılan antikorların poliklonal veya monoklonal olması sonuçları etkilemekte; monoklonal antikorların kullanıldığı test sistemlerinde duyarlılık yükselmektedir. Piyasada çok çeşitli İKT kitleri vardır. Bunlar içinde en sık kullanılanı ImmunoCard STAT HpSA (Meridian Bioscience) testidir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, erişkinlerde duyarlılığı %60-94.5, özgüllüğü ise %88.5-100 arasında bulunmuştur. Çocuklarda ise bazı çalışmalarda %86.2-88.1 gibi düşük duyarlılıkta, bazılarında da %90.6-100 gibi yüksek duyarlılıkta sonuçlar vermiştir (29). Beş yaş altı çocuklarda ise, düşük düzey kolonizasyondan dolayı dışkı ile atılan antijen miktarının az olmasından kaynaklanan duyarlılıkta düşmeler olabilmektedir.

Kaynaklar

1. Peeling RW, Mabey D. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(8):1062-9.
2. Bissonnette L, Bergeron MG. Diagnosing infections--current and anticipated technologies for point-of-care diagnostics and home-based testing. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(8):1044-53.
3. Ehrmeyer SS, Laessig RH. Point-of-care testing, medical error, and patient safety: a 2007 assessment. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(6):766-73.
4. Moore C. Point-of-care tests for infection control: should rapid testing be in the laboratory or at the front line? *J Hosp Infect* 2013; 85(1):1-7.
5. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, et al; Infectious Diseases Society of America (IDSA). Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2013; 57 Suppl 3:S139-70.
6. Pai NP, Vadnais C, Denking C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med* 2012; 9(9):e1001306.
7. Junker R, Schlebusch H, Luppä PB. Point-of-care testing in hospitals and primary care. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107:561-7.
8. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(3):231-40.
9. Clerc O, Greub G. Routine use of point-of-care tests: usefulness and application in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(8):1054-61.
10. ESCMID Sore Throat Guideline Group, Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, et al. Guideline for the management of acute sore throat. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 Suppl 1:1-28.
11. Honest H, Sharma S, Khan KS. Rapid tests for group B streptococcus colonization in laboring women: a systematic review. *Pediatrics* 2006; 117(4):1055-66.
12. Park JS, Cho DH, Yang JH, et al. Usefulness of a rapid real-time PCR assay in prenatal screening for group B streptococcus colonization. *Ann Lab Med* 2013; 33(1):39-44.
13. Matsui H, Kimura J, Higashide M, et al. Immunochromatographic detection of the group B streptococcus antigen from enrichment cultures. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20(9):1381-7.
14. Sordé R, Falcó V, Lowak M, et al. Current and potential usefulness of pneumococcal urinary antigen detection in hospitalized patients with community-acquired pneumonia to guide antimicrobial therapy. *Arch Intern Med* 2011; 171(2):166-72.
15. Stürenburg E, Junker R. Point-of-care testing in microbiology: the advantages and disadvantages of immunochromatographic test strips. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(4):48-54.
16. Piso RJ, Iven-Koller D, Koller MT, Bassetti S. The routine use of urinary pneumococcal antigen test in hospitalised patients with community acquired pneumonia has limited impact for adjustment of antibiotic treatment. *Swiss Med Wkly* 2012; 142:w13679.
17. Boulware DR, Daley CL, Merrifield C, Hopewell PC, Janoff EN. Rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia among HIV-infected adults with urine antigen detection. *J Infect* 2007; 55(4):300-9.
18. Formica N, Yates M, Beers M, et al. The impact of diagnosis by legionella urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of Legionnaires' disease. *Epidemiol Infect* 2001; 127(2):275-80.
19. Bruin JP, Diederer BM. Evaluation of Meridian TRU Legionella®, a new rapid test for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32(3):333-4.
20. Sværre CW, Lück C, Elverdal PL, Uldum SA. Immunochromatographic kits Xpect Legionella and BinaxNOW Legionella for detection of Legionella pneumophila urinary antigen have low sensitivities for the diagnosis of Legionnaires' disease. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt 2):213-7.
21. Marlow E, Whelan C. Legionella pneumonia and use of the Legionella urinary antigen test. *J Hosp Med* 2009; 4(3):E1-2.
22. Shimada T, Noguchi Y, Jackson JL, et al. Systematic review and meta-analysis: urinary antigen tests for legionellosis. *Chest* 2009; 136(6):1576-85.
23. Kılıç A. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors, pathogenesis, clinical features, diagnosis and therapy. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3):556-66.
24. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(12):1053-66.
25. Vasoo S, Stevens J, Portillo L, et al. Cost-effectiveness of a modified two-step algorithm using a combined glutamate dehydrogenase/toxin enzyme immunoassay and real-time PCR for the diagnosis of Clostridium difficile infection. *J Microbiol Immunol Infect* 2014; 47(1):75-8.
26. Carroll KC. Tests for the diagnosis of Clostridium difficile infection: the next generation. *Anaerobe* 2011; 17(4):170-4.
27. Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. Helicobacter pylori diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr* 2010; 169(1):15-25.
28. Korkmaz H, Kesli R, Karabagli P, Terzi Y. Comparison of the diagnostic accuracy of five different stool antigen tests for the diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2013; 18(5):384-91.
29. Kuloğlu Z, Kansu A, Kırşacıoğlu CT, et al. A rapid lateral flow stool antigen immunoassay and (14)C-urea breath test for the diagnosis and eradication of Helicobacter pylori infection in children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(4):351-6.

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

Sözel Bildiriler

OP - 001

Türkiye'de 2012-2013 Yılları Salgın Sürecinde Kızamık Viruslarının Moleküler Analizi: Genotip D8 Viruslarının Ülkemizde İlk Kez Görülmesi

Atıla Taner Kalaycıoğlu¹, Sultan Yolbakan², Dilek Güldemir³, Gülşay Korukluoğlu², Aslıhan Coşkun⁴, Yasemin Coşgun², Mehmet Ali Torunoğlu⁵, Rıza Durmaz⁶

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara; Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Trabzon

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Viroloji Referans Laboratuvarı, Ankara

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

⁴Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Aşı ile Önenebilir Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara

⁵Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları, Ankara

⁶Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara; Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Kızamık viruslarının epidemiyolojik verilerle birlikte moleküler analizi, sürveyans programları ve bulaşma zincirinin belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda, 2012-2013 yıllarında 75 olgudan izole edilen virusların moleküler analizi yapılmıştır. Bu amaçla viral nükleoproteini kodlayan genin 450 nükleotid uzunluğundaki karboksil uç (COOH-terminal) bölgesi sekanslanmıştır. Sekans verileri MeaNS (Measles Nucleotide Surveillance) veri tabanı ile analiz edilerek virusların genotipleri belirlenmiştir.

Sekans verilerinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kızamık referans virusları ve GenBank veritabanından elde edilen viruslara ait sekans verileri ile yapılan filogenetik analizinde; 59 olgudan elde edilen virusların D8 genotipinde, 11 virusun B3 genotipinde, 1 virusun D4 genotipinde ve 4 virusun aşı ile ilişkili olarak A genotipinde olduğu belirlenmiştir. D8 genotipindeki viruslar ülkemizde ilk kez bir salgın sürecinde tesbit edilmiştir. Genotip D8 virusları, Romanya, Fransa, İspanya, İngiltere, Bulgaristan gibi Avrupa ülkeleri ve ABD, Kanada, Lübnan gibi ülkelerde saptanan viruslar ile %100 sekans homolojisi göstermiştir. Epidemiyolojik verilerin ışığında salgının başlangıcında muhtemel kaynağın Romanya'dan gelen turistler olduğu belirlenmiştir. On bir olgudan elde edilen genotip B3 ve bir olgudan elde edilen genotip D4 viruslarının epidemiyolojik veriler ışığında imparte olgular ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma, DSÖ Avrupa bölgesi olarak 2015 yılı kızamık eliminasyonu hedefini amaçlayan ülkemizde duyarlı toplulukların varlığını göstermiştir. Eliminasyon hedefi sürecinde sürveyans çalışmalarının ve epidemiyolojik veriler ışığında virusların moleküler analizinin yapılması, etkenin eliminasyonu amacıyla yapılan aşılama programlarının etkinliğinin değerlendirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Anahtar sözcükler: Kızamık virusu, genotiplendirme

OP - 002

Ankara'da 0-5 Yaş Arası Çocuklarda Nested RT-PCR Yöntemi ile Rotavirus Genotiplerinin Belirlenmesi ve Elektroferotiplendirilmesi

Gülendam Bozdayı¹, Aylin Altay¹, Yıldız Dallar Bilge², Buket Dalgıç³, Melda Meral⁴, Bedia Dinç⁵, Bora Doğan⁶, Seçil Özkan⁷, Kamruddin Ahmed⁸

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²S.B. Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara

⁴Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

⁵Sağlık Bakanlığı Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji Lab. Ankara

⁶Alanya Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Alanya

⁷Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara

⁸Research Promotion Project, Oita University, Yufu, Oita, Japonya

Amaç: Bu çalışmada, Ankara'da Gazi Üniversitesi ve Ankara Eğitim Araştırma Hastanelerine başvuran 0-5 yaş arası akut gastroente-

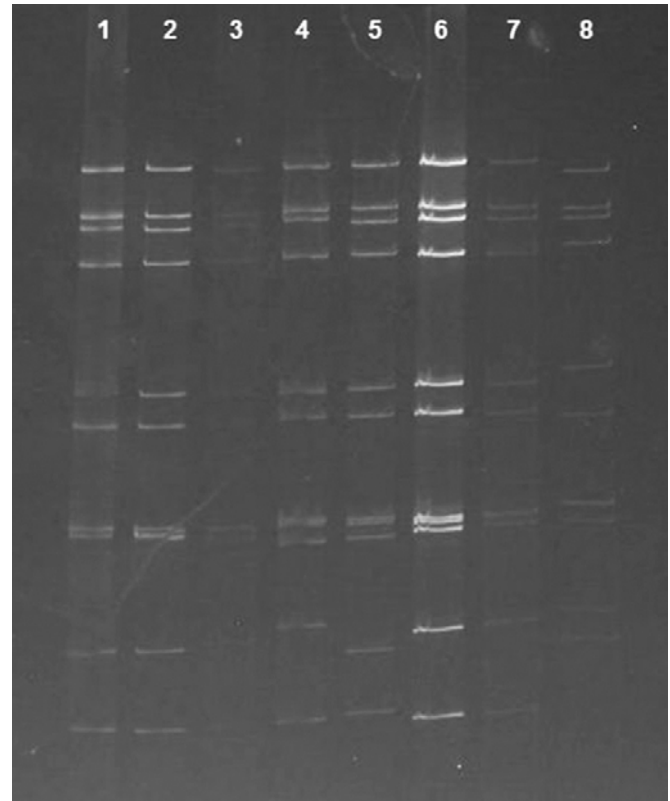
ritli çocuklarda rotavirus prevalansı, genotipleri ve elektroferotiplerinin belirlenmesi ile dizi analizlerinin yapılarak epidemiyolojik verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Ocak 2006-Temmuz 2011 tarihleri arasında gastroenterit şikayeti ile başvuran 889 olgu dahil edilmiştir. Olgulardan toplanan dışkı örneklerinde rotavirus antijeni, ELISA (Rotaclone®, Meridian Diagnostics, ABD) yöntemi ile saptanmış ve ELISA pozitif örneklerden fenol-kloroform-izoamilalkol yöntemi ile RNA elde edilmiştir. G genotiplerinin belirlenmesi için Beg9 ve End9, P genotiplerinin belirlenmesi için Con2 ve Con3 primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde; RNA ürünleri ise dikey elektroforez ile poliakrilamid jelde yürütülmüştür.

Bulgular: Örneklerin %27.1'inde ELISA ile rotavirus antijeni pozitif bulunmuştur. Rotavirus pozitifliği; yaşlara göre en sık 12-23 aylık çocuklarda (%34.8), yıllara göre 2006 yılında (%35.3) ve aylara göre en sık Mart ayında (%39.2) saptanmıştır. Antijen pozitif örneklerin PCR ile %76.3'ünde G, %79.6'sında P tipleri saptanmıştır. G tiplerinin %26.8'i G1, %30'u G2, %5.9'u G3, %2.7'si G4, %32.27'si G9, %0.45'i G1+G9 ve %0.45'i G2+G9 olarak tanımlanmış; %1.36'sının G tipi tanımlanamamıştır. P tiplerinin %22.6'sı P4, %4.98'i P6, %68.78'i P8, %0.45'i P9 ve %2.26'sı P4+P8 olarak tanımlanmış; %1.36'sının P tipi belirlenememiştir. G9P[8] tiplerinin ardından G1P[8] tipleri en sık karşılaşılan tipler olmuştur. Tiplendirilemeyen örneklerin (%3.3) dizi analizi yapılmıştır. Toplam 241 örnek PAGE'de yürütülmüş; 116 (%48.1) örnekte 11 segment görülmüş, bu örneklerde, 21 farklı elektroferotip tanımlanmıştır (Şekil).

Sonuç: Çalışmanın verilerine göre, G9 ve P8 tipinde yıllar içinde artış olduğu dikkati çekmektedir. Yıllara göre rotavirus sıklığı değerlendirildiğinde; 2006 yılından sonra aşının ülkemize girişi ile ishallerde hastalarda rotavirus görülme oranının azalmaya başladığı ve en sık görülen genotip olarak da G9 lehine değişiklik olduğu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Rotavirus, genotiplendirme



Şekil. PAGE'de yürütülmüş 11 segmentli rotavirus RNA örnekleri (Elektroferotip 1-5)

Ani Beklenmedik Bebek Ölümü (SUDI) Olgularında Parafine Gömülü Dokularda Gerçek Zamanlı PCR ile Sitomegalovirus (CMV) Enfeksiyonlarının Postmortem Tanısı

Gülhan Yağmur¹, Nihan Ziyade¹, Neval Elgörmüş¹, Taner Daş², Muhammed Fezyi Şahin³, Muzaffer Yıldırım², Ayşe Özgün², Arzu Akçay², Ferah Karayel², Sermet Koç³

¹Istanbul Adli Tıp Kurumu, Postmortem Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

²Istanbul Adli Tıp Kurumu, Histopatoloji Ünitesi, İstanbul

³Istanbul Adli Tıp Kurumu, Otopsi Ünitesi, İstanbul

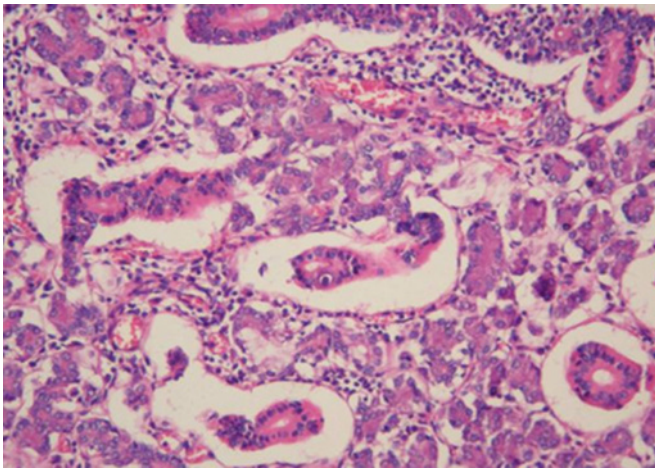
Amaç: CMV prematüre ve yenidoğan gibi immün sistemi yetersiz bireylerde ciddi hastalıklara neden olan, mortalitesi yüksek fırsatçı bir patojendir. Bu çalışmada İstanbul Adli Tıp Kurumuna otopsi için gönderilmiş olan "ani beklenmedik bebek ölümü" (Sudden Unexpected Death in Infancy; SUDI) olgularında klinik ve histopatolojik bulgularla CMV enfeksiyonu olabileceği düşünülen bebeklerin dokularında gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) ile CMV-DNA'nın gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Tükrük bezi dokularının postmortem histopatolojik incelemesinde 'baykuş gözü' görünümü (Şekil) saptanan olgularda, CMV sialadenitine eşlik eden interstisyel pnömoni, miyokardit, menenjit, hepatit, kolit veya tübülointerstisyel nefrit bulguları gösteren 31 bebeğin 72 doku örneği işleme alınmıştır. CMV-DNA izolasyonu QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Qiagen, ABD) ile QIASymphony cihazında, DNA'nın amplifikasyon işlemi Artus kiti (Qiagen) kullanılarak Rt-PCR yöntemiyle Rotor GeneQ (Qiagen) cihazında yapılmıştır.

Bulgular: İstanbul Adli Tıp Kurumunda Ocak 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında toplam 178 bebek otopsisinde yapılmıştır. Bebeklerin parafine gömülü dokularından yapılan Rt-PCR'da 15 bebeğin hem tükrük bezi hem de akciğer dokusunda CMV-DNA pozitif bulunmuş; 13 bebeğin tükrük bezinde CMV-DNA pozitif iken, akciğer dokusunda CMV-DNA negatif olarak saptanmıştır. Bebeklerde eşlik eden viral ve bakteriyel enfeksiyonlar da tespit edilmiştir. Bir bebeğin ise hem tonsil hem de beyin dokusunda CMV-DNA pozitifliği belirlenmiştir.

Sonuç: CMV, immün süpresif bir bebekte sialadenite eşlik eden ve fatal seyreden primer ve sekonder enfeksiyonlara neden olabilir. CMV enfeksiyonu düşünülen SUDI olgularında CMV-DNA'nın gösterilmesi, klinik ve histopatolojik değerlendirmeye birlikte etiyolojinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır. CMV'nin doğumsal ve perinatal geçişi önlenememesine rağmen, seropozitif annelerin bebeklerinin CMV enfeksiyonları açısından değerlendirilmesi ve tanıların konularak gereken tedavinin yapılması, CMV enfeksiyonlarına bağlı meydana gelen bebek ölümlerini önemli ölçüde azaltacaktır.

Anahtar sözcükler: Postmortem, sitomegalovirus



Şekil: Tükrük bezi dokusunda baykuş gözü görünümü (HEX20)

Stafilokokların Direkt Olarak Pozitif Kan Kültür Şişelerinden Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Sistemi Kullanılarak Tanımlanması

Abdullah Kılıç, Mehmet Baysallar

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Kan akımı enfeksiyonları tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Stafilokok türleri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kan kültürü örneklerinden en sık olarak izole edilen mikroorganizmalardır. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) sistemi, pozitif kan kültür şişelerinden direkt olarak bakteri tanımlamasına imkan sağlamaktadır.

Çalışmamızın amacı, Gram boyamada gram-pozitif kok görünen pozitif kan kültür şişelerinden direkt olarak stafilokok tanımlanmasında MALDI-TOF MS sisteminin performansını değerlendirmektir. Çalışmada rutin tanımlama işlemleri için BD Phoenix otomatize sistemi kullanılmış ve gerçek zamanlı (Rt)-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlar referans olarak kabul edilmiştir. Aralık 2013 - Şubat 2014 tarihleri arasındaki üç aylık dönem içerisinde, 69 hastaya ait 96 gram-pozitif kok görülmüş pozitif kan kültür şişeleri değerlendirilmiştir.

Rt-PCR ile karşılaştırıldığında MALDI TOF MS sisteminin *S.aureus*'u %100 cins ve tür düzeyinde, koagülaz negatif stafilokok (KNS)'ları %100 cins %96.6 tür düzeyinde tanımladığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, MALDI TOF MS sisteminin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan rutin yöntemler ile karşılaştırıldığında, direkt kan kültür şişelerinden *S.aureus* ve KNS'ları hızlı ve etkili bir biçimde tanımlama imkanı sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kan akımı enfeksiyonları, *Staphylococcus aureus*; MALDI TOF MS

Bulgaristan ve Türkiye'deki Çok İlaça Dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* Suşları Arasında Moleküler Biyofarklılık

Rıza Durmaz¹, Stefan Panaiotov², Alper Karagöz³, Elizabeta Bachiytska², Victoria Levterova², Nadia Brankova², Stanislava Yordonova², Juliana Atanasova², Todor Kantardjiev²

¹Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

²Ulusal İnfeksiyöz ve Paraziter Hastalıklar Merkezi, Sofya, Bulgaristan

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz sorunu dünyada giderek yaygınlaşması nedeniyle tüberkülozun epidemiyolojisi ve kontrol programları çok daha büyük önem kazanmıştır. ÇİD-TB suşlarındaki moleküler değişimin analizi, dominant genotiplerin orijini ve sirkülasyonu hakkında faydalı bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışmada, Bulgaristan ve Türkiye gibi iki komşu ülkede izole edilmiş olan ÇİD-TB suşları arasındaki filogenetik benzerliklerin irdelenmesi ve özellikle "LAM7-TUR" spoligo familyasının iki ülkedeki durumunun karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmanın yapıldığı merkezler, her iki ülkede de, tüm ülkeden izole edilen suşların gönderildiği ve doğrulandığı referans merkezlerdir. Çalışmada, Bulgaristan'da 2007-2013 yılları arasında tanımlanmış 218, Türkiye'de ise 2003-2012 yılları arasında tanımlanmış 177 ÇİD-TB suşunun spoligotiplendirme verileri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Bulgaristan verilerine göre; ÇİD-TB suşlarının 13 küme içerisinde toplandığı, en geniş kümenin 103 suş içerdiği ve Lam7-TUR (Spoligo-International Type=SIT41) spoligo familyasına mensup olduğu izlenmiştir. Bulgaristan'da SIT41 genotipini gösteren

ÇİD-TB olguları, 2007-2011 yılları arasında %45 (188/418) iken, 2012-2013 yılları arasında %60'a (30/50) yükselmiştir. SIT 53 (%14.2), SIT 284 (%7.7) ve SIT 1 (%3) ise diğer tipler olarak belirlenmiştir. Türkiye'de tanımlanan SIT'ler ve karşılık gelen familyaları; SIT41 (%28.2, LAM7-TUR), SIT53 (%35, T süperfamilyası), SIT50 (%11.8, Haarlem 3), SIT1261 (%1, LAM7-TUR), SIT 47 (%0.5, Haarlem 1), SIT284, (%1); ÇİD-TB familyalarının global dağılımı ise, T (%29), LAM (%33.5), Haarlem (%14), S (%3) ve Beijing (%1.3) şeklindedir.

Sonuç: Ülkemiz ve Bulgaristan'dan bildirilen bulgular karşılaştırıldığında "Turkish Family=LAM7-TUR" ve T1 (SIT53) her iki ülkede de sıkça saptanan SIT'ler arasında yer almaktadır. İlginç olarak, ülkemize özgü olarak tanımlanan "Turkish Family" filogenetik grup, komşu Balkan ülkesinde üç kat daha yüksek prevalansa sahiptir. Bulgular her iki ülkedeki tüberküloz basillerinin ortak filogenetik özellikte olduklarını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Çok İlaça Dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotiplendirme

OP - 006

2002–2013 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesinde İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarında *sasX* Geni Varlığının Araştırılması

Alper Tekeli¹, Duygu Öcal¹, Büşra Betül Özmen¹, İsmail Muaz Alay¹, Zeynep Ceren Karahan², İştah Dolapçı¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada 2002–2013 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesinde yatan hastaların klinik örnekleri ile sağlıklı bireylerin burun kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında, önemli bir virülans ve kolonizasyon faktörü olarak yeni tanımlanan *sasX* geni varlığının araştırılması ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 134'ü kan, 80'i trakeal aspirat, 113'ü apse ve 61'i burun (21 yatan hasta, 40 sağlıklı birey) izolatu olan toplam 388 MRSA suşu alınmıştır. *sasX* geni varlığı standart polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); *SCCmec*, *agr* tipleri ve toksin genleri ise multipleks-PCR ile çalışılmış; suşların klonal ilişkisi *Pulsed-field* jel elektroforezi (PFGE) ve *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) yöntemleriyle araştırılmıştır.

Bulgular: Üçü trakeal aspirat, biri apse izolatu olan dört (%1.03) suşta *sasX* geni tespit edilmiştir. Trakeal aspirat izolatlarının biri Mayıs-2007, diğer ikisi Mayıs-2008'de, apse izolatu ise Haziran-2005'te izole edilmiştir. *sasX*-pozitif izolatların hepsi *SCCmec* tip III ve enterotoksin genleri A ve D olarak saptanmış; *agr* tipi, tip-I bulunmuştur. PFGE analizinde, *sasX* gen pozitif suşların tek patern oluşturduğu ve MLST tipinin ST239 olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Hastanemizde 11 yıllık süreç içerisinde hastane kaynaklı kan, trakeal aspirat, apse ve burun kültürleri ile sağlıklı bireylerin burunlarından izole edilen MRSA suşlarının *sasX* gen pozitifliği ve genotipik özellikleri ortaya konulmuş; *sasX* geninin izolatların sadece %1.03'ünde bulunduğu, bu geni taşıyan tüm izolatların klonal özellik gösterdiği (ST239) tespit edilmiştir. Bölgesel ve Türkiye çapında *sasX* pozitifliğinin araştırılması, moleküler özelliklerinin virülans faktörleri ile birlikteliğinin ortaya konulması ve muhtemel değişimlerin izlenebilmesi için geniş çaplı ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *sasX* geni

OP - 007

Şanlıurfa'da *Plasmodium vivax* Alt Türleri ve Circumsporozoit Protein Geni Varlığının Araştırılması

Nebiye Yentür Doni¹, Adnan Seyrek², Fadile Yıldız Zeyrek³, Reşat Dikme¹, Gülcan Gürses¹

¹Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Şanlıurfa

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

³Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa

Amaç: Endemik bölgelerde sıtma türlerinin ve polimorfizmin belirlenmesinde en sık kullanılan gen *Plasmodium vivax circumsporozoit* protein geni (*Pvcsp*)'dir. *Pvcsp*, rekombinant sıtma aşısı çalışmalarının da başlıca hedefidir. Bu çalışmada, Şanlıurfa'da görülen ve nested PCR ile tespit edilen 14 *P.vivax* olgusunda *circumsporozoit* protein (CSP) gen bölgesinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: CSP'yi kodlayan *Pvcsp* gen bölgesi kullanılarak *P.vivax*'ın polimorfik genotipleme yapılmıştır. *P.vivax* parazitlerinin genotiplendirilmesinde *Pvcsp* gen bölgesini hedefleyen primerler, VCS-OF (5'-ATG TAG ATC TGT CCA AGG CCA TAA A-3') ve VCS-OR (5'-TAA TTG AAT AAT GCT AGG ACT AAC AAT ATG-3') kullanılarak nested-1 amplifikasyonu yapılmıştır. Nested-1 PCR sonucu elde edilen PCR ürününden 1.5 µl alınarak nested-2 PCR amplifikasyonu VCS-NF (5'-GCA GAA CCA AAA AAT CCA CGT GAA AAT AAG-3') ve VCS-NR (5'-CCA ACG GTA GCT CTA ACT TTA TCT AGG TAT-3') primerleri kullanılarak yapılmıştır. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) yöntemi ile *P.vivax*'ta tekrarlanan iki gen bölgesini (VK210 ve VK247) ayırt etmek için nested-2 PCR ürünleri, Alu1 ve Bst NI (Mva I) enzimleri ile kesilmiştir. Elektroforeze tabi tutulan DNA fragmanları etidyum bromürde 30 dakika boyandıktan sonra ultraviyole transilüminatör ile görüntülenmiştir.

Bulgular: PCR-RFLP sonuçlarına göre, Şanlıurfa'da görülen *P.vivax* suşlarının 2'si (%14.3) VK210, 12'si (%85.7) VK247 olarak tanımlanmıştır. Örneklerin hiçbirinde karışık tipe rastlanmamıştır.

Sonuç: Sıtmanın kontrolü ve eradikasyonu için, ilaç direnci geliştirilen suşların ve mutasyon gösteren alt türlerin belirlenmesinin, CSP bazlı aşı deneme çalışmaları ve sıtmanın endemik olduğu ülkemiz için yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Plasmodium Pvcsp*, VK210-VK247

OP - 008

Dermatofit Türlerinin Tanımlanmasında *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF) Kütle Spektrometrisi Yönteminin Standart Tanı Yöntemi ile Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Nilgün Karabıçak¹, Onur Karatuna², Macit İlkit³, Işın Akyar²

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarı, Ankara

²Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul; Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarları, İstanbul

³Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

Amaç: Bu çalışmada, tanısı uzun süre ve deneyim gerektiren dermatofit türlerinin doğru ve hızlı tanımlanmasında son zamanlarda mikroorganizma tanımlamalarında rutin olarak kullanımı yaygınlaşan MALDI-TOF MS sistemi ile geleneksel fenotipik tanımlama yöntemlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikoloji Referans Laboratuvarına, çeşitli hastanelerin dermatoloji kliniklerinden gönderilen ve dermatofitoz ön tanısı almış hastaların deri, saç, tırnak örneklerinden elde edilmiş ve mikro-makro morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre tanımlanmış 115 klinik izolat (3 cins, 5 tür) ve 21 referans tür (3 cins, 12 tür) dahil edilmiştir. MALDI-TOF MS çalışmaları Acıbadem Üniversitesi afiliye laboratuvarı olan Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada Bruker Autoflex 3 MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Dermatofit türlerinin incelenmesi için gerekli olan destek kütüphanesi "Bruker Daltonics MALDI BioTyper Software" yardımı ile 10 referans dermatofit türüne özgü elde edilen spektrumlarının kaydedilmesi ile oluşturulmuştur. Ardından 126 dermatofit türü [115 klinik izolat (3 cins, 5 tür) ve 11 referans tür (3 cins, 9 tür)] ile test edilmiştir. Cins ve tür düzeyinde tanımlama için üreticinin önerdiği skor değerleri ve çalışma kapsamında değerlendirilen skor değerleri kullanılmıştır.

Bulgular: Değerlendirilen 126 dermatofit türünün, 109'una (%86.5) MALDI-TOF MS yöntemi ile güvenilir tanı konulabilmiştir. On beş dermatofit [13 *T.rubrum* ve 2 *T.violaceum* (%11.9)] fenotipik yöntemler ile aynı tür olarak tanımlanmasına rağmen, saptama skoru güvenilir düzeyde bulunmamıştır. MALDI-TOF MS ile standart tanı 2 tür (%1.6) için uyumsuz bulunmuştur.

Sonuç: MALDI-TOF MS sistemi, dermatofitlerin tanımlanmasında doğru, hızlı, tekrar edilebilir ve maliyet-etkin bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Dermatofit, MALDI TOF-MS

OP - 009

***Helicobacter pylori*'nin *cagPAI* Genleri ve Bunların AGS Kansere Hücre Morfolojisi İle IL-8 Salınımına Olan Etkisi**

Barık Salih¹, Ahmet Güner¹, Ahu Karademir¹, Merve Uslu¹, Duygu Yazıcı¹, Mehmet Akif Ovalı², Bora Kazım Bölek³, Soykan Arıkan⁴

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

²Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale

³İstanbul Esenyurt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul

⁴İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Cerrahi Bölümü, İstanbul

Helicobacter pylori'nin *cag* patojenik adası (*cagPAI*) genleri, hastalık etmeninde büyük bir rol oynamakta; ancak Türk hastalarından izole edilen bu genlerin fonksiyonları hakkında yeterince bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, *H.pylori*'nin *cagPAI* bölgesinde bulunan *cagT*, *cagM*, *cagE*, *cagA* genleri ve *cagA* EPIYA motiflerinin AGS (insan gastrik kanser hücre kültürü) hücrelerinin morfolojik değişimi ile IL-8 salınımı üzerine olan etkisini araştırmaktır.

Çalışmaya alınan 53 hastanın 38'inde *H.pylori* varlığı hızlı üreaz testi, kültür ve PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. *cagPAI* genlerinin PCR ile amplifikasyonu, bu genlerin %42.1'inin bütün, %39.5'inin kısmi delesyonlu ve %18.4'ünün de tamamen delesyonlu olduğunu göstermiştir. Gastrit, duodenum ve mide ülseri hastalarından izole edilen *H.pylori* suşlarından bütün ve kısmi delesyonlu *cagPAI* genleri içerenlerin, tamamen delesyonlu olanlara göre IL-8 salınımını daha fazla artırdığı belirlenmiştir. Gastrit hastalarından izole edilen *H.pylori* suşlarında *cagT* ve *cagM* delesyon sıklığı diğer iki genden daha fazladır. AGS hücrelerinin, bütün *cagPAI* genlerine ve EPIYA-ABC motiflerine sahip olan izolatlar ile enfeksiyonu sonucu hücre morfolojisi değişimi ve *hummingbird* (hücrelerde uzama ve yayılma) fenotipi oluşumu saptanmıştır. *cagA* pozitif izolatlar, *cagA* negatif olanlara göre hücrelerden daha fazla IL-8 salgılanmasına neden olmuştur. Duodenum ülseri olan hastalarından elde edilen ve birden fazla EPIYA-C motifine sahip izolatlar da, EPIYA-ABC motifine sahip olanlara göre daha yüksek düzeyde IL-8 salgılanmasını indüklemiştir.

Sonuç olarak, hastalardan izole ettiğimiz *cagPAI* genlerinin bütün olma durumları korunmamıştır. Verilerimize göre, bütün *cagPAI* genlerinin, gastrit ve mide ülseri hariç, duodenum ülserinin patogenezinde oldukça önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür. *cagPAI* genlerinden sadece *cagA* geni, IL-8 salınımı ve AGS hücrelerinin morfolojik değişimleri ile ilişkilidir. *cagA* geninin EPIYA-C motif sayısındaki artış, *hummingbird* fenotipinin oluşumunda belirgin ölçüde etkilidir.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, *cagPAI* genleri

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

Poster Bildiriler

PP - 001

Beyin Apesine Neden Olan Nadir Bir Etken: *Prevotella denticola*

**Salih Maçın¹, Ahmet Çağkan İnkaya², Özlem Doğan Ayçık¹,
Gökhan Bozkurt³, Yeşim Çetinkaya Şardan⁴, Yakut Akyön Yılmaz¹**

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara

⁴Özel Ankara Güven Hastanesi, Ankara

Beyin apsesi nadir görülen ancak hayatı tehdit eden bir durumdur. Mikroorganizmaların beyin parankimine yerleşmesiyle başlar ve iyi vaskülerize bir kapsülle çevrili püye koleksiyonu gelişir. Gelişmiş ülkelerde tüm intrakranial lezyonlar arasında beyin apsesi insidansı %1-2 iken gelişmekte olan ülkelerde %8'e kadar çıkmaktadır. Beyin apsesinin fizyopatolojisinde sıklıkla görülen, beyine komşu bir odaktan enfeksiyonun yayılmasıdır. Maksiller sinüzit ve diş enfeksiyonları, orta kulak enfeksiyonları ve menenjit beyin apselerine yol açabilir. Genellikle travma veya cerrahi müdahale sonrası ortaya çıkar. Bu raporda, nadir görülen bir beyin apsesi etkeni olan *Prevotella denticola* nedeniyle kronik orta kulak enfeksiyonu sonrası gelişen bir olgu sunulmaktadır.

Otitis media nedeniyle yapılan beyin görüntülemesinde temporal lopta apse saptandığı için hastanemize sevk edilen 27 yaşındaki erkek hasta tetkik ve takip amacıyla hastanemize yatırılmıştır. Yatışının ikinci gününde mastoidektomi ve temporal apse drenajı yapılmış; apse materyelinden yapılan yaymaların mikroskopik incelemesinde gram-negatif kokobasiller görülmüştür. Apse materyelinden hem aerobik hem de anaerobik ekimler aynı anda yapılmıştır. Aerobik kültürlerde herhangi bir üreme gözlenmemiştir. Schaedler agara ekilen ve anaerob koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edilen kültürlerde ise esmer renkte pigment oluşturan koloniler saptanmıştır. Kültürden yapılan Gram boyamaları mikroskopik incelemesinde soluk boyanan, küçük gram-negatif kokobasiller görülmüştür. Yarı otomatize sistem (BBL Crystal, Becton Dickinson, ABD) ile izolat *Prevotella* spp. olarak belirlenmiştir. Bunun üzerine 16S RNA analizi yaptırılmış ve analiz sonucunda *Prevotella denticola* olarak tanımlanmıştır.

Anaerobik bakterilerle oluşan beyin apsesi enfeksiyonları erken tanı ve uygun tedavi ile genellikle tedavi edilebilir enfeksiyonlardır. Dolayısıyla hastanın anamnezinin detaylı sorgusu ve fizik muayene bulguları erken tanı koymada büyük önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Beyin apsesi, *Prevotella denticola*

PP - 002

Hacettepe Üniversitesi Hastanelerine Başvuran Hastalardan İzole Edilen *Helicobacter pylori* Suşlarında Klaritromisin Direncinin Fenotip ve Genotipinin Belirlenmesi

**Salih Maçın¹, Koray Ergünay¹, Gülin Hızal³, Özben Özden¹,
Gökhan Baysoy³, Halis Şimşek², Hasan Özen³, Sibel Ergüven¹,
Yakut Akyön Yılmaz¹**

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi ve Erişkin Hastanesi Gastroenteroloji bilim dallarına başvuran ve endoskopi yapılan hastaların biyopsi örneklerinden izole edilen *Helicobacter pylori* suşlarında, klaritromisin direncinin fenotipik olarak konsantrasyon gradyent (E-test) yöntemi, genotipik olarak ise DNA dizi analizi yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testi E-test ile çalışılmış, klaritromisine dirençli 59 izolat saptanmıştır. Bu izolatların hangi hastalardan izole edildiği belirlenmiştir. Hasta bilgilerinden, daha önce *H.pylori* tedavisi almamış olan 15 hasta tespit edilmiştir. Bu hastaların 9'u çocuk grubundadır. Onbeş hasta izolatı dizi analizi ile değerlendirilmiştir. Dizi analizinde, Cy5.5 dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, İngiltere) üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılarak PTC-200 "Gradient Thermal Cycler"da (MJ Research, ABD) sekans reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham veriler Gen Bankası ile karşılaştırılmış, ayrıca klaritromisin direnci ile ilişkili bölgelerde mutasyonlar araştırılmıştır. Hem dizi analizi hem de antibiyotik duyarlılık testi için *H.pylori* NCTC 11637 standart suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

Dizi analizine alınan 15 izolatın hepsinde A2142G mutasyonu saptanmıştır. A2143G mutasyonu 1 izolat hariç diğer 14 izolatta saptanmıştır. T2289C mutasyonu 2 erişkin hastanın izolatında ayrıca saptanmıştır. Bir erişkin izolatında, iki ana mutasyon dışında, G2141A, G2224A ve T2182C mutasyonları da saptanmıştır. Beklenildiği gibi *H.pylori* NCTC 11637 standart suşunda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

A2142G, A2143G mutasyonları en sık rastlanan ve Avrupa ülkelerinde tespit edilen ana mutasyonlardır. Diğer mutasyonlar sıklıkla Kuzeydoğu ülkelerinden ve Çin'den bildirilen mutasyonlardır. Ülkemizdeki klaritromisin direncine neden olan mutasyonların paternini gösterebilmek için daha fazla sayıda izolat ile çalışma yapılması gereklidir.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, klaritromisin direnci

PP - 003

Vankomisine Dirençli Enterokokların Sürveyansında PCR (Gene Xpert™ *vanA/vanB*) ile Kültür Yönteminin Karşılaştırılması

**Hatice Uludağ Altun¹, Çiğdem Ataman Hatipoğlu², Cemal Bulut²,
Sami Kınıklı², Ali Pekcan Demiröz²**

¹Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

²Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

Amaç: Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) önemli hastane enfeksiyonu etkenidirler. Bu çalışmanın amacı, VRE kolonizasyonun tespitinde PCR ile kültür yönteminin karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Ocak-Eylül 2013 tarihleri arasında hastanemizin yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan Amies transport besiyeri kullanılarak alınan 210 perirektal sürüntü örneği aynı zamanda PCR ve kültür yöntemi ile değerlendirilmiştir. PCR yöntemi için Gene Xpert™ *vanA/vanB* (Cepheid, CA) cihazı kullanılmıştır. Kültür için örnekler enterokokosel agara ekilerek 3 gün boyunca değerlendirilmiştir. Üreyen koloniler konvansiyonel yöntemler ve otomatize Vitek 2.0 sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanılarak tanımlanmıştır. Üreyen enterokokların direnç durumu E-test ile doğrulanmıştır.

Bulgular: PCR yöntemi ile örneklerin 76'sında (%36.1) VRE saptanmış; 70'i *vanA*, 2'si *vanB*, 4'ü *vanA+vanB* olarak tespit edilmiştir. Kültür yöntemi ile aynı örneklerin 71'inde (%33.8) VRE saptanmıştır. PCR ile *vanB* olarak tespit edilen iki örnek, kültürde üreyen kolonilerin Vitek cihazı ile değerlendirilmesi sonucu VSE olarak tanımlanmıştır. Ancak bu örnekler E-test ile VRE olarak doğrulanmış ve PCR ile alınan sonucun doğru olduğuna karar verilmiştir. PCR ile iki kez çalışılmasına rağmen geçersiz (invalid) sonuç veren bir örnek, kültür ile negatif olarak saptanmıştır (Tablo). Gene-expert *vanA/vanB* assay PCR cihazının duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %97.4, %98.4, %97.4 ve %97.4 olarak belirlenmiştir. Kültürün duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise sırasıyla %91, %100, %100 ve %94.9 olarak saptanmıştır.

Sonuç: Gene-expert *vanA/vanB* assay yöntemi kısa sürede sonuç alınabilmesi sebebiyle kültür yöntemlerine göre giderek daha cazip görünmekle birlikte, maliyet açısından kültüre göre daha pahalıdır. Bu nedenle her laboratuvarın kendi imkanlarına göre en uygun yöntemi seçmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: VRE, GeneXpert

Tablo. Perirektal sürüntü örneklerinin PCR ve kültür sonuçları

Örnek sayısı	PCR Sonucu	Kültür Sonucu	
128	-	-	
65	vanA	+	
4	vanA+vanB	+	
5	vanA	-	
2	vanB	-	
2	Yanlış negatif	+	Vankomisin direnci E-test ile doğrulandı
2	Yanlış pozitif	-	Tekrarlanan örnekte PCR negatif saptandı
1	Geçersiz	-	

PP - 004

Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında OXA-48 Geninin ve Klonal İlişkinin Araştırılması

Gülfem Ece¹, Emine Tunç², Barış Otlu², Deniz Aslan³, Cem Ece⁴

¹İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

³İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İzmir

⁴Menemen Devlet Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, İzmir

Amaç: *Klebsiella pneumoniae* özellikle yoğun bakım ve pediatri biriminde morbidite oluşturan nozokomiyal patojendir. GSBL ve karbapenemaz üreten suşlar salgın yapabilir. Çalışmamızda hastanemizin farklı kliniklerden izole edilen karbapeneme dirençli *K.pneumoniae* suşlarında OXA-48 geni ve klonal ilişkinin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 1 Nisan-30 Haziran 2013 arasında anestezi yoğun bakım, üroloji ve hematoloji kliniklerinden gönderilen örneklerden izole edilen karbapeneme dirençli 41 *K.pneumoniae* izolatı alınmıştır. İzolatların 7'si trakeal aspirat, 4'ü kan, 1'i idrar, 1'i yara ve 1'i balgamdan üretilmiştir. İzolatların tanımlaması ve antibiyotik duyarlılıkları otomatize Vitek2 Compact (BioMerieux, Fransa) sisteminde çalışılmıştır. Karbapenemaz üretimi modifiye Hodge testi ile taranmış, E-test ile doğrulanmıştır. İzolatlarda OXA genlerinin varlığı *in-house* PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Suşlar arasındaki klonal yakınlık, *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) ve otomatize *repetitive extragenic palindromic* PCR (Rep-PCR, Diversi-Lab sistemi, BioMerieux, Fransa) yöntemleri ile gösterilmiştir.

Bulgular: İzolatların tümü karbapeneme dirençli, gentamisin ve kolistine duyarlıdır. Suşların tümünde modifiye Hodge testi pozitif bulunmuştur ve hepsinde OXA-48 geni saptanmıştır. Genotiplendirmede 8 izolat hem Rep-PCR (benzerlik sınırı ≥ 95) hem de PFGE (Tennover kriterine göre) ile aynı küme içerisinde yer almıştır. Diğer izolatlar her iki yöntemle de herhangi bir küme içerisinde yer almamıştır. Aynı küme içerisinde yer alan suşların tamamı anestezi yoğun bakım ünitesindeki hastalardan üç aylık bir dönemde izole edilmiştir. Suşların kümeleşme oranı her iki yöntemle de %57'dir.

Sonuç: Çalışmamızda değerlendirile tüm suşlarda OXA-48 geni saptanmıştır. Anestezi yoğun bakımda, yayılımın klonal olduğu gösterilmiştir. Hastane enfeksiyonu etkenlerinin moleküler epide-

miyolojik olarak izlenmesi dirençli patojenlerin takibinde önemlidir. Merkezimizden bildirilen bu verilerin dirençli *Klebsiella* izolatlarının yayılımının kontrolünde faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar sözcükler: Karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae*, moleküler epidemiyoloji

PP - 005

Vankomisine Dirençli Enterokokların Direnç ve Virülans Faktörlerinin Moleküler Epidemiyolojisi

Mehtap Ünlü Söğüt¹, Şule Kırcı Yılmaz², Selma Uludağ Keleş³, Gökçen Tosun⁴, Timur Gülhan⁵, Alper Çiftçi⁵

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Samsun

²Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Giresun

³Giresun Devlet Hastanesi, Giresun

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

⁵Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

Günümüzde tüm dünyada nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan enterokok suşlarının artan çoklu antimikrobiyal direnç gelişimi, özellikle virülans faktörleri gibi birçok özelliklerinin daha ayrıntılı incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen vankomisine dirençli enterokokların virülansında rol oynayan faktörlerin, direnç genlerinin ve genotipik olarak benzerliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında Giresun Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ekim 2012-Nisan 2013 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (kan, idrar, aspirasyon ve perirektal sürüntü) izole edilmiş olan ve fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunan 37 adet *Enterococcus faecium* izolatları incelenmiştir. Çalışma kapsamında incelenen izolatların biyofilm üretimleri, fenotipik olarak Kongo Red Agar (CRA) yöntemi ile araştırılmış ve tüm izolatlar *slime* faktör pozitif olarak değerlendirilmiştir. Vankomisine dirençlilik durumları fenotipik ve genotipik olarak incelenmiştir. Vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri kullanılarak yapılan sıvı mikrodilüsyon testinde, izolatların tümü vankomisin ve teikoplanine dirençli olarak bulunmuştur. İzolatların genotipik özelliklerinin belirlenmesi için PCR ile *vanA*, *vanB*, *esp*, *gelE*, *hyl*, *cylA* ve *asa1* genleri araştırılmıştır. *E.faecium* izolatlarının *vanA*, *esp*, *gelE* ve *hyl* genlerini sırasıyla %100, %62.2, %2.7 ve %27 oranlarında içerdiği belirlenmiştir. İzolatlarda *vanB*, *asa1* ve *cylA* genleri ise saptanamamıştır. *E.faecium* izolatlarının moleküler tiplendirilmesinde rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi kullanılmıştır. Genotiplendirme sonucunda izolatların 10 farklı RAPD profiline sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu olan vankomisine dirençli *E.faecium* suşlarının fenotipik ve genotipik olarak çeşitlilik gösterdiği ve bu enfeksiyonlara karşı alınacak önlemlerde bu farklılıkların göz önüne alınması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Vankomisine dirençli enterokok, moleküler epidemiyoloji

PP - 006

UPEC Suşlarında İnsülin ve Glukozun *usp*, *sfa/foc*, *cnf 1* Genlerinin Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Defne Gümüş¹, Gülşen Uz², Neslinur Özçelik², İlky Civelek², Yunus Emre Elma², Sabahattin Ekin², Sevde Hasanoğlu², Ayşegül Topal Sarıkaya², Mine Anç Küçükler¹

¹Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

Amaç: Mikroorganizmalarda, genlerin ekspresyonlarının çevresel koşullarla ilişkili oldukları bilinmektedir. Bu çalışmada, üropatojen *E.coli* (UPEC) suşlarında saptanmış olan *sfa/foc* (S ve F1C fimbria), *cnf 1* (cytotoxic necrotizing factor) ve *usp* (uropathogen-specific protein) genlerinin, insülin ve glukoz içeren ve içermeyen

ortamlardaki ekspresyon düzeylerindeki olası değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu üç virülans genini taşıyan üç farklı UPEC suşu ve bir kontrol UPEC suşu (C7) çalışmada kullanılmıştır. Suşlar, glukoz ve insülinin farklı konsantrasyonlarını (%0.1 glukoz, 20 µU insülin, 200 µU insülin ve %0.1 glukoz+200 µU insülin) içeren ve içermeyen triptik soy buyyon (TSB) besiyerlerinde üretilmişlerdir. Suşlardan, total RNA izolasyonu yapılmış ve genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, özgül primerler kullanılarak, kantitatif RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. Genlerin ekspresyon düzeyleri, 16S rRNA'ya oranlanarak *pfaffl* denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak one-way ANOVA testi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Üreme ortamına eklenen insülin ve glukozun, üç virülans geninde de ekspresyonu artırdığı ve denenen suşlarda 20 µU insülin ve 200 µU insülin içeren ortamların her üç genin ekspresyonu üzerine etkisinin aynı olduğu bulunmuştur. Üreme ortamları kıyaslandığında, gen ekspresyon düzeyinde en fazla artışın %0.1 glukoz+200 µU insülin içeren ortamda ortaya çıktığı saptanmıştır.

Sonuç: In vivo koşulların, virülans genlerinin ekspresyon koşullarını etkileyerek enfeksiyon hastalıklarının patogenezinde belirleyici bir unsur olabileceği; idrar yolu enfeksiyonları ve etkenleri açısından bir örnek oluşturduğu kanısına varılmıştır.

Teşekkür: RT-PCR deneyleri için Hibriğin laboratuvarının olanaklarını kullanmamızı sağlayan MSc. Umut Büyük'e teşekkür ederiz. Bu çalışma TÜBİTAK'ın 2209 no'lu programı tarafından desteklenmiştir.

Anahtar sözcükler: Üropatojenik *E.coli*, virülans

PP - 007

Staphylococcus aureus ve Koagülaz Negatif Stafilokokların Ayrımında 1,2-Dinitro-4,5-bis (2-kloretoksi) Benzen Etkinliğinin Araştırılması

Çağrı Ergin¹, Yaşar Gök², İlnur Kaleli¹, Nilgün Kabay², Orçun Zorbozan¹, Osman Acar¹, Özgün Kiriş Satılmış¹, Yüksel Akkaya¹

¹Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli
²Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Denizli

Amaç: Hayatı tehdit eden enfeksiyon etkeni *Staphylococcus aureus*'un koagülaz negatif stafilokok (KNS)'lardan ayrımı gereklidir. Manuel çalışılan koagülaz testinin yerini alabilecek, otomatize sistemlere uygun kimyasallar, laboratuvarların daha efektif ve hızlı sonuç vermesini sağlayacaktır. Sunulan çalışmada, kimya bölümünde sentezlenen 1,2-dinitro-4,5-bis (2-kloretoksi) benzen bileşiğinin hızlı ayırmda kullanımı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada, Kloos ve Schleifer akım şeması ile tanımlanan 462 KNS, 242 *S.aureus* ve 10 standart köken kullanılmıştır. Optimizasyon sonrası reaksiyonlar üç farklı yöntemle değerlendirilmiştir. (i) disk difüzyon yöntemi (DDY) ile oluşan rengin görsel değerlendirilmesi (n=244); (ii) tüp testi yöntemi (TTY) ile oluşan rengin görsel değerlendirilmesi (n=205); (iii) tüp testi ile oluşan rengin spektrofotometrik değerlendirilmesi yöntemi (SFMY) (n=714). Görsel değerlendirmeler altı farklı bağımsız araştırmacı tarafından yürütülmüştür.

Bulgular: DDY ve TTY gruplarının her birinde farklı birer araştırmacı (%16.6) doğru sonuçlara ulaşabilmiştir. SFMY ile KNS kökenleri arasında *S.capitis*, *S.caprae*, *S.cohnii*, *S.lugdunensis*, *S.saprophyticus*, *S.schleiferi*, *S.simulans* ve *S.xylosus* kökenleri *S.aureus* kökenlerine yakın değerler verirken, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* ve *S.warneri* kökenlerine ait değerler istatistiksel farklılık göstermiştir. Bu verilere göre, SFMY ile *S.aureus* kökenleri (uç değer veren KNS kökenleri hariç) ayrılabilir (p<0.01).

Sonuç: 1,2-dinitro-4,5-bis (2-kloretoksi) benzen bileşiği *S.aureus*'un sık görülen KNS etkenlerinden ayrımında (SFMY ile) hızlı test olarak kullanılabilir. Oluşan reaksiyonun mekanizması henüz bilinmemektedir. Bu sonucun geçerli olabilmesi için, klinik mikrobiyoloji

laboratuvarları arasında eşgüdümlü araştırmalar planlanmalıdır. Sunulan araştırma TÜBİTAK (No:211T113) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokok

PP - 008

Enterokok Suşlarının Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE) Yöntemiyle Moleküler Tiplendirilmesi

Dilek Güldemir¹, Alper Karagöz², Tuba Dal², Alicem Tekin², Rıza Durmaz¹

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara
²Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Amaç: Enterokoklar nozokomiyal üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının ikinci, bakteriyemilerin ise üçüncü en sık nedenidir. Günümüzde, özellikle vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) nozokomiyal enfeksiyonların önemli etkenleri arasında yer almakta olup, VRE salgınlarını kontrol altına almak gereklidir. Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE), enterokokal enfeksiyonların epidemiyolojik analizinde "altın standart" kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı; hastane kaynaklı *Enterococcus* spp. izolatlarının PFGE profilleri (pulsotip) arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek ve olası çapraz bulaşı ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Kasım 2010-Haziran 2012 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Hastanelerinin çeşitli kliniklerinde yatan hastalardan izole edilen 36 enterokok suşu dahil edilmiştir. Otuz altı suşun 18'i idrar, 6'sı kan, 5'i bronkoalveolar lavaj, 5'i yara, 1'i vajinal sürüntü, 1'i ise kateterden izole edilmiş olup, 9'u VRE olarak tanımlanmıştır. İzolasyon ve tanımlama, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında, PFGE çalışması ise Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: PFGE yöntemiyle izolatların DNA paternleri elde edilmiş ve bu paternlerin dendogramı yapılmıştır. DNA paternlerinin birebir karşılaştırılması sonucu 27 izolatın, %97 benzerlikle ortak bir kümede yer aldıkları görülmüştür. Otuz altı suşun 7 küme ve 2 ana grup oluşturduğu saptanmıştır. Kümeleşme oranı %75 (27/36) olup, kümelerin 2-14 arasında suş içerdiği belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Kasım 2010-Haziran 2012 tarihleri arasında nozokomiyal enfeksiyona neden olan enterokok suşları arasında çapraz bulaş oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu veriler, enfeksiyon kontrol programlarının daha etkin biçimde uygulanmasının önemini ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: Enterokok, pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)

PP - 009

Karbapeneme Dirençli *P.aeruginosa* İzolatlarında oprD Porin Protein Düzeylerinin İncelenmesi

Hüseyin Agah Terzi¹, Canan Külah², Ali Rıza Atasoy¹, İhsan Hakkı Çiftçi¹

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya
²Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Zonguldak

Pseudomonas aeruginosa'daki dış membran proteini oprD'nin kaybıyla karbapenemlere duyarlılık azalabilmektedir. Bu çalışmada, karbapeneme dirençli klinik *P.aeruginosa* izolatlarında oprD porin proteininin dirence etkisinin araştırılması ve moleküler yöntemlerle oprD ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 18 *P.aeruginosa* klinik izolatının antibiyotik duyarlılık testleri CLSI önerileri doğrultusunda, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Çalışmada çoklu ilaç dirençli (ÇİD) ve izole karbapenem dirençli (İKD) olmak üzere 2 farklı grup

oluşturulmuştur. Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, otomatize Vitek 2 sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. oprD'nin transkripsiyon ürün düzeyleri LightCycler cihazı (Roche, Almanya) kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle saptanmıştır. Suşlar arasındaki genotipik benzerlik ilişkisini göstermek için *arbitrarily primed* PCR (AP-PCR) yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızdaki oprD düzeylerindeki azalma imipeneme dirençli 18 *P.aeruginosa* klinik izolatının 13'ünde anlamlı bulunmuştur. oprD'de anlamlı azalma gösteren suşların 9'u birinci gruptaki ÇİD izolatlarında görülmüş ve diğer grupla (İKD) karşılaştırıldığında birinci grubun istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p=0.001$). İkinci gruptaki İKD izolatlarında oprD düzeyleri 9 izolatın 4'ünde anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Suşlar arasındaki benzerlikler, AP-PCR yöntemiyle değerlendirildiğinde 7 farklı patern tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler, imipenem direnciyle ilgili temel mekanizmanın dış membran proteini oprD'nin kaybı olabileceğini desteklese de, oprD'nin rolünü tam olarak açıklamamakta ve başka mekanizmaların da rolü olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, ÇİD suşlarındaki oprD miktarında görülen bu anlamlı azalma, oprD'nin karbapenem grubu dışındaki antibiyotiklere direnç gelişiminde de rol oynadığına işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: *P.aeruginosa* OprD porin proteini, oprD ekspresyonu

PP - 010

Farklı Direnç Fenotiplerindeki *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının AmpC β -laktamaz Ekspresyon Düzeyleri

Hüseyin Agah Terzi¹, Canan Külah², İhsan Hakkı Çiftçi¹

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya
²Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Zonguldak

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa*'daki AmpC üretimi anlamlı derecede arttığında, karbapenemler hariç bütün β -laktamlara direnç gelişmektedir. Bu çalışmada farklı direnç fenotiplerindeki *P.aeruginosa* izolatlarının ampC ekspresyon düzeyleri ve AmpC β -laktamaz enziminin dirence etkisi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya dahil edilen 49 *P.aeruginosa* klinik izolatının antibiyotik duyarlılık testleri, CLSI önerileri doğrultusunda, disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) otomatize Vitek 2 sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. İzolatlar dört farklı gruba ayrılmıştır: 1. Grup, çoklu ilaç dirençli (ÇİD); 2.Grup, izole karbapenem dirençli (İKD); 3.Grup, hem karbapenem hem de kinolon dirençli ve 4. Grup, izole kinolon dirençli izolatlar. ampC bölgesinin transkripsiyon ürün seviyesi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle LightCycler cihazı (Roche, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızdaki 49 klinik izolatın 23'ünde (%47) ampC aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Grup 1, 2, 3 ve 4 için ortalama ekspresyon değerleri sırasıyla 3717.66 ± 4344.20 , 6.96 ± 13.52 , 1.26 ± 1.31 ve 0.54 ± 0.30 olarak belirlenmiştir. Aşırı ekspresyon gösteren suşların 21'i (%91) ÇİD izolatları içeren birinci grupta görülmüş ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında birinci grubun istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p=0.001$). İKD izolatların ikisinde (%22) aşırı ekspresyon tespit edilmiştir. 3. ve 4. grupta ise AmpC aşırı üretimi görülmemiştir.

Sonuç: AmpC aşırı üretimi *P.aeruginosa*'nın karbapenem direncine tek başına etki etmemekte, ilave direnç mekanizmaları birliğinde dirence katkı sağlayabilmektedir. ÇİD ve İKD izolatlarının ampC ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; β -laktamaza daha dirençli gibi görünen karbapenemlerin antipsödomonal olarak kullanımı önerilebilir.

Anahtar sözcükler: *P.aeruginosa* AmpC beta-laktamaz aşırı üretimi, ampC ekspresyonu

PP - 011

Mycobacterium tuberculosis Tanısında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması

İhsan Hakkı Çiftçi¹, Engin Karakeççeli¹, Sinem Hızal¹, Yusuf Aydemir², Hüseyin Agah Terzi¹

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya
²Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Sakarya

Amaç: Bu çalışmada, klinik örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) suşlarının tanımlanması ve izolasyonu için kullanılan yöntemlerin irdelenmesi ve tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) suşlarının hsp65 fragmanlarının analizleri ile tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Homojenizasyon ve dekontaminasyon sonrası örnekler Ehrlich-Zielh-Neelsen (EZN) tekniği ve *Auromine-Rhodamin* (AUR) ile boyanarak, aside dirençli basil (ARB) varlığı açısından incelenmiştir. Ardından Löwenstein-Jensen (LJ) ve Middlebrook 7H9 tüplerine kültür ekimleri yapılmıştır. hsp65 geni için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) Tb11 ve Tb12 primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri RFLP analizleri için BsuRI ve Eco911 enzimleri ile muamele edilmiş gerçek zamanlı elektroforez uygulanmıştır. Elde edilen bantlar büyüklüklerine göre analiz edilmiştir.

Bulgular: Çalışmada 1866 (%95.5) balgam, 29 (%1.5) aspirasyon sıvısı, 36 (%1.8) bronkoalveoler lavaj, 24 (%1.2) idrar olmak üzere 685 hastaya ait toplam 1975 örnek incelenmiştir. Örneklerin ARB, AUR, LJ ve MGIT için pozitiflik oranları sırasıyla; %7.1 (141), %8.2 (162), %9.6 (190) ve %11.2 (221) olarak belirlenmiştir. LJ ve/veya MGIT pozitifliği ise %11.8 (234) olarak saptanmıştır. MGIT 960 otomatize sistemiyle pozitif bulunan 221 örnek 81 hastaya ait olup, bunlardan 71'i (%87.7) MTK olarak tanımlanmıştır. Tanımlama çalışmalarında MTK olarak tanımlanamayan kültür pozitifliklerinin 10'unda (%12.3) hsp65 gen gölgesi çoğaltılmıştır. Gen bölgesi çoğaltılan izolatların enzimlerle gerçekleştirilen kesim sonrası yapılan analizlerde; 4'ü *M.intracellulare*, 2'si *M.gordonae* /*M.xenopi*, 1'i *M.peregrinum*, 1'i *M.peregrinum*/*M.scrofulaceum*, 1'i *M.szulgai*/*Mycobacterium* spp. ve 1'i *Mycobacterium* spp. olarak tanımlanmıştır. **Sonuç:** MTK için ortaya konan pozitiflik oranları, TDM oranı ve TDM dağılımı literatürle benzer olup, tüberküloz sıklığı bakımından ilk sıralarda yer alan Sakarya'dan bildirilen ilk veriler olması nedeniyle önemlidir.

Anahtar sözcükler: Tüberküloz, moleküler tanı

PP - 012

Siğirilerde Enfeksiyona Neden Olan Yedi Patojen Bakterinin Çoklu ve Gerçek Zamanlı Çoklu PCR İle Tanısı

Hamit Kaan Müştak, Yörük Divanoğlu, Ebru Torun, Özlem Şahan, Hakan Yardımcı, Mehmet Akan, Kadir Serdar Diker

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Bu çalışmada, insan sağlığını da olumsuz etkileyen başta *Mycobacterium tuberculosis* olmak üzere siğirilerde *Mycobacterium paratuberculosis*; genital sistem enfeksiyonlarına neden olan *Mycoplasma bovis* ve *Histophilus somni*; solunum sisteminde problemlere neden olan *Mannheimia haemolytica*, *M.bovis*, *H.somni* ve *Pasteurella multocida* enfeksiyonları ve buzağı kayıplarının en önemli nedeni olan buzağı ishallerinden sorumlu *Salmonella* türlerinin hızlı ve doğru tanısını gerçekleştirmek için çoklu ve gerçek zamanlı çoklu PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla araştırma kapsamındaki türlere özgü gen bölgeleri seçilerek oligonükleotid primer setleri tasarlanmıştır. Gerçek zamanlı çoklu PCR yönteminde SYBR Green boyası kullanılmıştır. Bütün reaksiyonlar optimize edilerek özgüllük ve duyarlılıkları belirlenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda, her bir bakteri türüne özgü tekli, çoklu ve gerçek zamanlı çoklu PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen optimize edilmiş kitlelerle, siğir yetiştiriciliğinde önemli

ekonomik kayıplara neden olan enfeksiyöz bakteriyel hastalıkların tanısının hızlı ve doğru bir şekilde gerçekleştirilmesi sağlanmıştır.
Anahtar sözcükler: PCR, sığır

PP - 013

Stafilokokları Doğru Tanımlıyor muyuz?

Özge Kılınçel, Nida Kılıç, Fatma Avcıoğlu, Cihadiye Elif Öztürk, Şükrü Öksüz, İdris Şahin

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce

Stafilokokların doğru ve çabuk tanımlanması, etken olduğu hastalığın prognozu açısından önemlidir. Bu çalışmada, stafilokokların tanımlanmasında tam otomatize sistem, tüpte koagülaz (TK) ve lamda koagülaz (LK) yöntemlerinin kullanımları değerlendirilmiştir. Çalışmaya, hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında Mayıs 2013 – Mart 2014 arasında klinik örneklerden üretilen 236 stafilokok suşu dahil edilmiştir. Ayrıca mikrobiyoloji uzmanlarına anket uygulanarak stafilokok tanısında kullandıkları tanı yöntemi sorulmuştur.

VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) sistemiyle *S.aureus* olarak tanımlanan bütün izolatlarda TK testi pozitif iken, *S.aureus* dışında kalan 191 suşun hepsinde negatif bulunmuştur. Buna göre VITEK 2 referans yöntem olarak kabul edildiğinde TK testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değeri (NPD) %100 olarak saptanmıştır. LK testi sonuçları değerlendirildiğinde; 236 suşun 123'ü pozitif, 113'ü ise negatif bulunmuştur. Buna göre LK testinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD sırasıyla %100, %59, %36.5 ve %100 olarak hesaplanmıştır. Otuz sekiz mikrobiyoloji uzmanıyla yapılan anketin sonuçlarına göre; 13'ünün (%34.2) sadece LK testini, 17'sinin (%44.7) sadece TK testini, 8'inin (%21.1) ise her iki testi birlikte kullandığı öğrenilmiştir.

Çalışmamızda, *S.aureus* ile koagülaz negatif stafilokokların (KNS) ayrımında LK testinin negatifliği değerli bulunmuşken, pozitifliğinin TK testi gibi ek bir test yöntemiyle mutlaka doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca *S.aureus*'da %15 oranında LK testinin negatif bulunabileceğiyle ilgili yayınlar da vardır. Anket sonuçlarına göre sadece lam testini kullanan mikrobiyoloji uzmanlarının oranı %34.2 olduğuna göre, *S.aureus* olarak izole ettikleri suşların büyük bir bölümünün KNS olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Tanımlamada her iki testin birlikte yapılarak değerlendirilmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Stafilokok, koagülaz testi

Tablo. Stafilokok suşlarının dağılımı ve test sonuçları

VITEK 2 ile tanımlanan izolatlar	Suş Sayısı	LK Testi Pozitif n (%)	TK Testi Pozitif n (%)
<i>S.aureus</i>	45	45 (100)	45 (100)
<i>S.epidermidis</i>	79	55 (69.6)	0
<i>S.hominis ssp. hominis</i>	58	29 (50)	0
<i>S.haemolyticus</i>	31	24 (77.4)	0
<i>S.capitis</i>	13	11 (84.6)	0
Diğer*	10	4 (40)	0
Toplam	236	168 (71)	45

**S.caprae*, *S.xylosum*, *S.auricularis*, *S.cohnii*, *S.intermedius*, *S.sciuri*, *S.simulans*, *S.warneri*

PP - 014

Klinik Örneklerden Üretilen *E.coli* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Pulsed-Field Jel Elektrofrezisi ile Genotipik Profillerinin Araştırılması

Alper Karagöz¹, Mahmut Sünnetçioğlu², Mehmet Reşat Ceylan², Yasemin Bayram³, Nadir Koçak⁴, Ahmet Andaç⁵

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara
²Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van

³Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van

⁴Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Konya

⁵Mevlana Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Konya

Giriş: Antibiyotik direnci, gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açmakta ve giderek büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları arasında en sık görülenlerden biri, sentezlenen enzimlerle ilacın inaktive edilmesidir. Beta-laktam grubu antibiyotikleri hidroliz eden beta-laktamaz enzimleri bu tip dirence en iyi örnektir. Bu çalışmada, çeşitli servislerden laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklerden izole edilen *E.coli* suşlarının direnç profilleri ve Pulsed-field jel elektrofrezisi (PFGE) yöntemiyle yapılan genotipik profilleri karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: 2009-2012 yılları arasında laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden konvansiyonel yöntemlerle izole edilen 34 *E.coli* suşunun disk difüzyon yöntemiyle antibiyogramları yapılmıştır. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılık paneli belirlenen suşların PFGE yöntemiyle DNA bant profilleri oluşturulmuş ve Gel Compar II Software v.3.0 (Applied Maths, Belçika) yazılım sistemi ile dendrogram yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda toplam 34 adet *E.coli* suşu fenotipik ve genotipik olarak incelenerek birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İzolatlar 21 farklı antibiyotiğe duyarlılıkları açısından değerlendirilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık tablolarına göre dört farklı antimikrobiyal direnç paterni saptanmıştır. XbaI enzimiyle gerçekleştirilen restriksiyon işlemi sonunda yapılan PFGE analizinde ise 2 majör PFGE profili elde edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile, salgınların önüne geçilebilmesi için *E.coli*'nin genotipik profillerinin belirlenmesi, sürveyans çalışmalarının yapılması ve sağlık personelinin eğitilmesinin gerekli olduğu bir kez daha vurgulanmıştır. Ayrıca *E.coli* enfeksiyonu tanısı konulduğu durumlarda, sıkı enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması için moleküler tiplendirme yöntemlerinin önemi ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: *E.coli*, moleküler tiplendirme

PP - 015

Çoğul İlaç Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Pulsed-Field Jel Elektrofrezisi ile Klonal İlişkisinin Araştırılması

Mehmet Reşat Ceylan¹, Mustafa Kasım Karahocagil¹, Alper Karagöz², Aytekin Çıkman³, Rıza Durmaz²

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara

³Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Erzincan

Giriş: Bu çalışma ile, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *A.baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranının saptanması ve hastane enfeksiyonu etkeni çoklu ilaç direncine sahip izolatların klonal ilişkisinin, pulsed-field jel elektrofrezisi (PFGE) yöntemi kullanılarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon (A-R), Göğüs Hastalıkları ve Pediatri yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde Ocak 2010-Ekim 2011; ayrıca A-R yoğun bakım ünitesinde Temmuz-Kasım 2012

tarihleri arasında takip edilen, ventilatör ile ilişkili pnömoni (VİP) tanısı alan 63 ve primer kan dolaşımı enfeksiyonu (PKDE) tanısı alan 6 hasta olmak üzere toplam 69 hastaya ait izolat alınmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları, imipenem, kolistin ve tigesiklin için E-test, diğer antibiyotikler için disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır.

Bulgular: Tüm suşlar için en etkili antibiyotikler, kolistin (%98.6) ve tigesiklin (%97.1) olarak saptanmıştır. Suşların tamamı seftriakson, piperasilin/tazobaktam, sefotaksim, meropenem ve imipenem dirençli bulunmuştur. *A.baumannii* izolatlarının Apal enzimi ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE analizi ile, 69 *A.baumannii* suşunun 62 (%89.9)'sinin küme içinde olduğu belirlenmiştir. Bu suşlar 16 küme içinde yer almaktadır. Suşların 7'si (%10.1) özgül PFGE profili göstermiş ve suşlar arasında 23 pulsotip saptanmıştır.

Sonuç: Çoğul ilaç dirençli *A.baumannii* izolatlarının kümeleşme oranının yüksek bulunması ve benzer genotipteki izolatların farklı ünitelerdeki hastalardan izole edilmesi, bu bakterinin hastanemiz YBÜ'nde endemik duruma geçtiğinin göstergesidir. Önlem alınmadığı takdirde *A.baumannii* uzun yıllar boyunca hastanelerde kalabilmekte ve hastalar arasında kolaylıkla bulaş olabilmektedir. Özellikle çapraz bulaşın önlenmesi için, enfeksiyon kontrol programlarının gerekliliği ve öneminin bir kez daha vurgulanmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

(Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2012-TF-U037 numaralı proje olarak desteklenmiştir.)

Anahtar sözcükler: *A.baumannii*, PFGE

PP - 016

Acinetobacter baumannii İzolatlarında Karbapenem Direnci ve Atım Pompa İlişkisi

Hüseyin Agah Terzi¹, Ali Rıza Atasoy¹, Engin Karakeçe¹, Gülşah Aşık², İhsan Hakkı Çiftci¹

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya
²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon

Acinetobacter baumannii izolatlarında karbapenem direncinden; dış membran geçirgenliği, penisilin bağlayan protein değişiklikleri ve karbapenemaz üretimi başta olmak üzere birçok mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Bu çalışmada, farklı OXA tipi karbapenemazlara sahip *A.baumannii* izolatlarında AdeR ve AdeS atım pompa sistemleri araştırılmıştır.

A.baumannii izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri Vitek2 otomatize sistemi (bioMérieux, Fransa) ile yapılmış; *blaOXA-51*, *blaOXA-23*, ve *blaOXA-58* genlerinin varlığı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile araştırılmıştır. *adeR* ve *adeS* genlerinin transkripsiyon ürün düzeyleri Fluorion cihazı (Iontek, Türkiye) kullanılarak qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. Karbapenem direnci ve *blaOXA* içeren izolatlardan 5 farklı grup oluşturulmuştur. Gruplar; karbapeneme duyarlı *blaOXA-51* pozitif (I. grup), karbapeneme dirençli *blaOXA-51* pozitif (II. grup), karbapeneme dirençli *blaOXA-51* ve *blaOXA-23* pozitif (III. grup), karbapeneme dirençli *blaOXA-51* ve *blaOXA-58* pozitif (IV. grup) ve karbapeneme dirençli *blaOXA-51*, *blaOXA-23* ve *blaOXA-58* pozitif (V. grup) şeklindedir.

Çalışmamızda incelenen izolatların 27'sinde (%90) *adeR* ve *adeS* atım pompa genlerinin varlığı saptanmıştır. Sadece V. grupta yer alan 3 izolatta *adeR* ve *adeS* atım pompa genlerinin varlığı, kullanılan primer çiftleri ile saptanamamıştır. Gruplar için *adeR* ortalama ekspresyon düzeyleri sırasıyla 4,25.109, 1,48.109, 2,47.109, 3,17.109 ve 6,20.109; *adeS* ortalama ekspresyon düzeyleri ise sırasıyla 3,95.109, 1,94.108, 2,25.108, 4,47.108 ve 8,07.108 olarak belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz veriler *A.baumannii* izolatlarında karbapenem direnciyle ilgili temel mekanizmanın *blaOXA* genlerinin varlığı olabileceğini desteklese de, bu enzimlere ilave direnç mekanizmalarının da karbapenem direncine katkı sağlayabileceği söylenebilir. Atım pompa sistemlerinden *adeR* ve *adeS* genlerinin tespit edilemediği

izolatların *blaOXA-51*, *blaOXA-23* ve *blaOXA-58* pozitif bulunması dikkat çekicidir.

Anahtar sözcükler: *A.baumannii adeR* ve *adeS* atım pompa sistemleri, OXA tipi karbapenemazlar

PP - 017

Mycobacterium tuberculosis'de İzoniazide Karşı Nokta Mutasyon İle Oluşan İlaç Direncinin Yeni Bir Yöntem Kullanarak Tespiti

Ayhan Kubar, Abdullah Kılıç, Mehmet Ali Saraçlı, Ali Albay

GATA, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Bu çalışmanın amacı, PCR reaksiyonunun özgül olarak bloklanmasını sağlayan peptid nükleik asit (PNA) oligonükleotidlerinin kullanıldığı bir test sisteminin uygulanması ile, izoniazid ilaç direncinde en sık olarak karşılaşılan *katG315* nokta mutasyonunun prototip seçilerek yeni bir tanı kitinin geliştirilmesidir. Projede uygulanan yeni (PNA) mutasyon analiz sistemi PCR temelli olup, primer olarak kullanılacak oligonükleotidlerin herhangi bir modifikasyonu bulunmamaktadır. Yapılan ön çalışmalar, prop olarak dizayn edilen oligo modifikasyonunun özgül mutasyon bölgesini içermesi nedeniyle, nükleotid değişimlerinin, yani nokta mutasyonlarının analizinde kullanılabileceğini ve PNA oligoları ile de mutasyona özgül PCR testlerinin yapılabileceğini göstermiştir.

Yaptığımız ön çalışmalar ile, yeni geliştirilen mutasyon analiz sisteminin *M.tuberculosis* bakterisinde karşılaştığımız *katG315* nokta mutasyonlarını tespit etmede başarılı olduğu belirlense de, sistemin rutin uygulamaya girebilmesi için, özellikle yalancı pozitiflik durumu ve duyarlı olduğu mutant bakteri sayısı gibi bir dizi araştırmaya daha ihtiyacı olduğu görülmüştür. Diğer yandan, proje ile geliştirilen bu uygulamanın, izoniazid direncinde ortaya çıkan *katG315* mutasyonu ve rifampisin direncinde de *rpoB* gen bölgesinde oluşan diğer nokta mutasyonlarının analizinde bir bütün olarak kullanılıp/kullanılmayacağı da araştırılmalıdır. Eğer sistem izoniazid ve rifampisin ilaç direncinde nokta gen mutasyonunu birlikte başarılı olarak tespit edebilirse, aynı metodun söz konusu bakterinin diğer ilaçlara direncine neden olan farklı gen mutasyonlarına da daha sonra başarı ile uygulanması mümkün olacaktır.

Anahtar sözcükler: Peptid nükleik asit, *Mycobacterium tuberculosis*

PP - 018

Vankomisine Dirençli Enterokok Suşlarının Klonal Analizinde Rep-PCR DiversiLab ile Pulsed-Field Jel Elektrofrezisi Yönteminin Karşılaştırılması

Gülşen Hazırolan¹, Dilek Güldemir², Neriman Aksu¹, İrmak Baran¹, İpek Mumcuoğlu¹, Seyit Ahmet Bayık¹, Alper Karagöz², Rıza Durmaz³

¹Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı; Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

Amaç: Son yıllarda, rep-PCR DiversiLab sistemi mikroorganizmaların daha kolay ve hızlı tiplendirilmesini sağlayan bir cihaz olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, sürveyans amaçlı alınan rektal sürüntü, çevre kültürleri ve çeşitli klinik örneklerden izole edilen vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşlarının epidemiyolojik yakınlıklarının incelenmesinde rep-PCR DiversiLab ile Pulsed-field jel elektrofrezisi (PFGE) sonuçları arasındaki uyumun araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya, 09 Kasım 2011 - 14 Aralık 2011 tarihleri arasında hastanemizde yatan hastalardan alınan rektal sürüntü örneklerinden, çevre kültürlerinden ve klinik materyallerden izole edilen 48 VRE suşu alınmıştır. Suşların moleküler epidemiyolojik tiplendirilmesi amacıyla otomatize repPCR DiversiLab

(bioMérieux, Fransa) ve PFGE yöntemi kullanılmıştır. Suşlar, Bio-numerics (version 6.01; Applied Maths, Belçika) yazılım sistemi ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Rep-PCR DiversiLab ile parmak izi analizi sonrası yapılan değerlendirmede toplam 4 klon belirlenmiştir. A, B, C, D klonlarında sırayla 2, 2, 35, 3 VRE suşu bulunmakta olup, 6 izolat ise hiçbir klonla ait değildir. Tenover ve arkadaşlarının kriterine göre, toplam 48 suşun DNA paternlerinin birebir karşılaştırılması sonucu 6 genotip belirlenmiştir. Bu suşlar 1 özgül profil, 5 kümeden oluşmaktadır. Küme içerisindeki suş sayısı 4-25 arasında değişiklik göstermiştir. Küme içerisindeki suş sayısı 47, kümeleşme oranı ise %97.9 (47/48) olarak belirlenmiştir. PFGE yöntemi ile benzerlik oranı %85 ve üzeri alındığında suşların %97.9'u birbiriyle klonal yönden ilişkili bulunmuştur.

Sonuç: PFGE'in DiversiLab Rep-PCR'den daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu gözlenmiştir. DiversiLab rep-PCR, PFGE'ye göre daha hızlı (3-4 güne karşı 4 saat) ve uygulaması kolay yarı otomatize bir sistem olmasından dolayı VRE tiplendirmesinde PFGE'e alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Vankomisine dirençli enterokok (VRE), moleküler subtiplendirme

PP - 019

Kan Örneklerinden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Klonal İlişki ve Karbapenem Direncinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Ayşegül Gözalan¹, Özlem Ünal², Tuba Müderis¹, Fisun Kırca¹, Rıza Durmaz³, Ziya Cibali Açıköz³

¹Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara

³Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: *Acinetobacter baumannii*, özellikle yoğun bakım ünitesi hastalarında yüksek mortalite hızına sahip ciddi enfeksiyonlara sebep olabilen bir mikroorganizmadır. Son yıllarda intrinsik ve kazanılmış antibiyotik direncine sahip *A.baumannii* salgın sıklığında artış gözlenmektedir. *A.baumannii* karbapenem direncinden sıklıkla OXA tipi karbapenemazlar ve metallo-beta-laktamazlar sorumludur. Bu çalışmada, kan örneği kaynaklı *A. baumannii* izolatları arasındaki olası klonal ilişkilerin ve son yıllarda saptanma oranı gittikçe artan karbapenem direnç genlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastaların kan örneklerinden üretilen karbapeneme dirençli 46 izolat değerlendirilmiştir. Suşların izolasyon ve tanımlama işlemleri standart yöntemlerle yapılmış; karbapenem dirençleri disk difüzyon yöntemiyle gösterilmiştir. Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek için *Pulsed-field* jel elktroforezi (PFGE) yöntemi kullanılmıştır. Karbapenem direnç genlerinin (*OXA23*, *NDM1*, *KPC*, *VIM*, *IMP* ve *OXA58*) varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır.

Bulgular: Tiplendirilmeye alınan 46 *A.baumannii* suşunda 21 farklı pulsotip saptanmıştır. Pulsotiplerden 9'u birbiriyle ayırt edilemez profili gösteren ≥ 2 suş içermektedir. Kümelerin genişliği 2-11 suş arasında değişmektedir. Kümeleşme oranı %74 olarak hesaplanmıştır. Pulsotipler arasındaki benzerlik oranı ≥ 85 alındığında, yalnızca 5 suşun epidemiyolojik olarak ilintisiz oldukları, 41 (%89) suşun ise dört epidemiyolojik grup içerisinde toplandıkları kaydedilmiştir. Suşların tamamında *OXA-23* karbapenemaz geni saptanmıştır.

Sonuç: *A.baumannii* suşları arasında saptanmış olan klonal ilişki ve ortak karbapenem direnç geni varlığı, hastalar arası çapraz bulaş bulunduğunu düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *A. baumannii*, hastane enfeksiyonları

PP - 020

Cronobacter sakazakii'nin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Suzan Öztürk Yılmaz¹, Engin Karakeçe², Mehmet Köroğlu², İhsan Hakkı Çiftçi²

¹Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

Enterobacter sakazakii, insan ve hayvanların gastrointestinal sistem florasında bulunabilen önemli bakterilerden biridir. Bu bakteri yeni adlandırma ile *Cronobacter* spp. olmuş ve *Enterobacter sakazakii*'nin alt türleri *Cronobacter sakazakii*'nin alt türleri olarak değiştirilmiştir. Bu çalışmada, farklı gıda örneklerinde *C.sakazakii* varlığı ve otomatize tanımlama yöntemlerinin bakteriyi tanımlamadaki verimliliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Bölümü ve Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji birimlerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, 55 gıda örneği incelenmiş, konvansiyonel bakteriyolojik çalışmaların takiben otomatize sistem (Vitek 2, BioMérieux, France) ile tanımlama ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları yapılmıştır. Moleküler tanımlama için sekans cihazı (ABI 3100, Applied Biosystems, ABD) ile DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen nükleik asit dizileri NSBI (National Center for Biotechnology Information) veri bankası üzerinden analiz edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 55 örneğin 3'ünde (%5.5) *C.sakazakii* saptanmıştır. Tüm izolatların sefazolin, sefuroksim, sefuroksim aksetil ve sefoksitine dirençli olduğu saptanmıştır. Örneklerden elde edilen izolatların nükleik asit dizileri NCBI veri tabanında bulunan *C.sakazakii* 16S rRNA (KJ123710.1) gen bölgesi ile %99 uyumlu bulunmuştur.

Özellikle immün yanıt yetersizliklerinde enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkabilen *C.sakazakii* tanımlanmasında, konvansiyonel yöntemlere kıyasla hızla tanımlama imkanı veren otomatize sistemler kullanılabilir. Zira konvansiyonel yöntemlerle 72 saate kadar uzayabilen tanımlama işlemleri 6-12 saat gibi kısa bir sürede yapılabilmektedir. Çalışmada irdelenen *C.sakazakii* izolatları için saptanan birinci ve ikinci kuşak sefolosporin direnci dikkat çekici bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *Cronobacter sakazakii*, gıda örneği

PP - 021

Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz Pozitif *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Plazmid Aracılı Kinolon Direncinin Araştırılması

Gül Bayram Abiha¹, Nuran Delialioğlu², Gürol Emekdaş², Candan Öztürk², Mehmet Sami Serin³

¹Mersin Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mersin

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

³Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

Kinolonlar bakterisidal etkili kemoteropötik ajanlar olup hem gram-pozitif hem gram-negatif bakterilere etkilidirler. Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten bakterilerde florokinolonlara karşı yüksek direnç oranları bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kinolon direncinde görülen artışın, plazmidle bağlı direnç genlerinin aktarımına bağlı olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada GSBL pozitif ve kinolon grubu antimikrobiallere dirençli *E.coli* ve *K.pneumoniae* klinik izolatlarında dirençten sorumlu *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*), *qepA* ve *aac(6)-Ib-cr* gen bölgelerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Ocak 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden (idrara, kan doku, abse ve yara) izole edilen GSBL pozitif ve kinolon grubu antimikrobiallere (siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasin) di-

rençli olan 59 *E.coli* ve 15 *K.pneumoniae* izolatında polimeraz zicir reaksiyonu ile *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*), *qepA* ve *aac(6)-Ib-cr* gen bölgeleri araştırılmıştır.

Çalışmamızda, *aac(6)-Ib-cr* gen bölgesi 59 *E.coli* ve 15 *K.pneumoniae* suşunda pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu gen bölgesine ek olarak, üç *E.coli* ve bir *K.pneumoniae* izolatında *qnrS*, bir *K.pneumoniae*'da *qnrB*, bir *E.coli*'de *qepA* geni pozitif olarak saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde *qnrC* ve *qnrA* gen bölgelerinin varlığı bulunmamıştır.

Sonuç olarak kinolon direncinin, izolatların hepsinde pozitif olarak bulunan *aac(6)-Ib-cr* plazmid direnç genine bağlı olduğu saptanmıştır. Ülkemizde kinolon direncinden sorumlu gen bölgelerinin tespiti için moleküler ve epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), kinolon direnci

PP - 022

Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında OXA-48 Geninin ve İzolatlar Arasındaki Klonal İlişkinin Araştırılması

Tuba Kayman¹, Elif Kaya², Bülent Bozdoğan³, Emine Tunç⁴, Ahmet Gödekmerdan⁵, Barış Otlu⁴

¹Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

²Adnan Menderes Üniversitesi, BİLTEM, Aydın

³Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

⁴İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

⁵Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada, yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiş *K.pneumoniae* suşlarında OXA-48 direnç geninin varlığı ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Mayıs 2011-Mayıs 2012 tarihleri arasında Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiş, her biri farklı hastaya ait olan ve 12'si idrar, 5'i kan, 2'si yara, 2'si de trakeal aspirat örneğinden izole edilen 21 *K.pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların tanımlama ve antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 otomatize tanımlama sistemiyle (bioMerieux, ABD) gerçekleştirilmiştir. ESBL pozitif ve karbapenem dirençli olarak belirlenen suşların tümünde Modifiye Hodge testi ile karbapenemaz varlığı gösterilmiştir. OXA-48 gen varlığı, *in house* PCR yöntemiyle araştırılmıştır. İzolatlar arasındaki klonal yakınlığın belirlenmesi için ise *pulsed-field* jel elektroforezi (PFGE) yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Test edilen *K.pneumoniae* suşlarının tümünde OXA-48 geni pozitif olarak saptanmıştır. PFGE yöntemiyle Dice benzerlik katsayısı kullanılarak yapılan UPGMA kümeleşme analizinde 13 farklı bant profili elde edilmiştir. Tenover kriterlerine göre yapılan değerlendirmede 21 izolat yedi farklı küme içerisinde yer alırken, K-I (11 izolat içeren) ve K-II genotipi (5 izolat içeren) olmak üzere iki büyük küme oluşmuştur. Her iki küme içerisinde yer alan suşların tamamı anestezi yoğun bakım ünitelerinden, bir yıllık süre içerisinde izole edilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda, hastanemiz yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *K.pneumoniae* suşları arasında OXA-48'in yaygın olduğu saptanmış ve yayılımın klonal olduğu ortaya konmuştur. Dirençli suşların moleküler epidemiyolojik yöntemlerle takip edilmesi, bu izolatlarla bağlı enfeksiyonların klonal yayılımının önlenmesi için gerekli stratejilerin geliştirilmesini sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: Karbapenem direnci, *Klebsiella pneumoniae*

PP - 023

Çoklu İlaç Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Oksasilinaz Genlerinin Araştırılması

Nida Özcan, Tuba Dal, Şükran Can, Alicem Tekin, Kadri Gül

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Amaç: Son yıllarda karbapenemlerin de dahil olduğu çoklu ilaç direnci, *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı enfeksiyonların tedavisini oldukça zorlaştırmıştır. Çalışmamızın amacı, *A.baumannii*'de karbapenem direncinin en önemli nedeni olan OXA tipi beta-laktamaz-oksasilinaz- genlerinin varlığını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Dicle Üniversitesi Hastanelerinin yoğun bakım ünitelerinde tedavi görmekte olan hastaların, Ekim 2012- Şubat 2013 tarihleri arasında gönderilen klinik örneklerinden izole edilen, BD PhoenixTM 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatik sistemi ile *A.baumannii* olarak tanımlanan ve geleneksel yöntemlerle *A.baumannii* olduğu doğrulanan, çoklu ilaç dirençli 80 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Karbapenem dirençli izolatlarda multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *blaOXA-51*-benzeri, *blaOXA-23*-benzeri, *blaOXA-58*-benzeri ve *blaOXA-40*-benzeri gen gruplarının varlığı araştırılmıştır. Moleküler yöntem olarak hyplex® CarbOxa ID (Amplex, Almanya) test sistemi kullanılmıştır. İlgili gen kümelerinin PCR ile amplifikasyonu ve elde edilen amplifikasyon ürünlerinin ELISA temelli bir sistemde özgül oligonükleotid problarla hibridizasyonu sağlanmıştır.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 80 izolatın, 46 (%57.5)'si erkek, 34 (%42.5)'ü kadın hastalara aittir. İzolatların 32 (%40)'si trakeal aspirat, 21 (%26.25)'i kan, 11 (%13.75)'i yara, 10 (%12.5)'u kateeter, 5 (%6.25)'i idrar, 1 (%1.25)'i dren örneğinden izole edilmiştir. *A.baumannii*'ye özgü yapısal bir gen grubu olan *blaOXA-51*-benzeri gen grubu, izolatların 77 (%96.25)'sinde saptanmıştır. *BlaOXA-23*-benzeri gen grubu ise, izolatların 48 (%60)'inde mevcuttur. İzolatların 12 (%15)'sinde *blaOXA-58*-benzeri, 8 (%10)'inde *blaOXA-40*-benzeri gen grubu tespit edilmiştir. İzolatların 65 (%81.25)'inde; *blaOXA-23*-benzeri, *blaOXA-58*-benzeri veya *blaOXA-40*-benzeri genlerinden en az birisi mevcuttur. Oksasilinaz genlerinin yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı tabloda gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda, hastanemizin yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *A.baumannii* suşlarında oksasilinaz gen varlığı oranının yüksek olması, tedavi başarısızlığı ve mortalite için büyük risk oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, oksasilinaz

Tablo. Oksasilinaz genlerinin yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı

Yoğun Bakım Üniteleri	<i>blaOXA-23</i> -benzeri	<i>blaOXA-58</i> -benzeri	<i>blaOXA-40</i> -benzeri
Dahiliye	12	1	2
Nöroloji	8	3	-
Göğüs Hastalıkları	7	-	-
Çocuk Hastalıkları	5	1	3
Genel Cerrahi	3	1	-
Anestezi ve Reanimasyon	1	-	3
Kardiyoloji	3	-	-
Yanık Ünitesi	1	2	-
Beyin Cerrahisi	2	1	-
Diğer Klinikler	6	3	-
Toplam	48	12	8

PP - 024

Bir Yoğun Bakım Ünitesinde Hasta ve Çevre Örneklerinden İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Olarak Değerlendirilmesi

Bayhan Bektöre¹, M. Burak Selek¹, Tuğba Kula Atik¹, Ümit Karakaş¹, Orhan Baylan¹, Oral Öncül², Mustafa Özyurt¹

¹GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

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

Amaç: Bu çalışmada, yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan bir hastanın klinik örneklerinden ve sürveyans kültürlerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenem direncinin araştırılması ve *Arbitrarily Primed* (AP)-PCR ile izolatlar arası genetik ilişkinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, bir yoğun bakım hastasının solunum yolu ve kan örneklerinden izole edilen iki invazif *K. pneumoniae* izolatına ek olarak, sürveyans kültürleri sonucu elde edilen aynı hastanın kasık ve rektal sürüntü izolatları, başka bir hastaya ait kasık ve koltuk altı izolatu ve bir yatak başı sürüntü izolatu alınmıştır. Karbapenem direncinin genotipik olarak araştırılması amacıyla OXA-48 primerleri kullanılarak PCR uygulanmıştır. İzolatlar arası genetik ilişkinin gösterilmesi amacıyla M13 primerinin kullanıldığı AP-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Yatak başı hariç, dört çevresel izolat ve invazif iki izolatu fenotipik olarak benzer antibiyotik duyarlılık paternlerine sahip olduğu tespit edilmiş ve disk difüzyon yöntemi ile test edilen tüm antibiyotiklere (ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, aztreonam, sefazolin, sefuroksim, sefepim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin, amikasin, tobramisin, meropenem, piperasilin-tazobaktam) dirençli olarak bulunmuştur. Yatak başı hariç, toplam 6 izolat OXA-48 pozitif ve AP-PCR yöntemiyle benzer bant paternlerine sahip oldukları görülmüştür.

Sonuçlar: Bir karbapenemaz geni olan OXA-48 ülkemizde sıklıkla görülmekte ve ciddi sorunlara yol açmaktadır. OXA-48 taşıyan bakteriler ilaç duyarlılık testlerinde zaman zaman karbapenemlere duyarlı olarak görülse de, bu ajanlarla yapılan tedavilerde başarısızlık görülebilmektedir. AP-PCR gibi amplifikasyona dayalı bir yöntemim, ayırım gücü ve standardizasyonu altın standart kabul edilen PFGE kadar yüksek ve iyi olmasa da, mikrobiyoloji laboratuvarlarında ucuz ve hızlı sonuç alınabilir olması ve gelişmiş teknik altyapı gerektirmemesi gibi nedenlerle tercih edilebilecek bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: AP-PCR, OXA-48

PP - 025

İmmün Sistemi Baskılanmış Bir Hastada *Listeria monocytogenes* Menenjitisi

Serpil Ölmez¹, Nesibe Nur Aydın¹, Deniz Can Güven³, Ahmet Çağkan İnkaya², Şehnaz Özyavuz Alp², Sibel Aşçıoğlu², Yakut Akyön Yılmaz¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

Listeria monocytogenes kontamine süt, peynir, az pişmiş et ve sebzele bulaşabilen bir zoonoz etkenidir. Gebelerde, yenidoğanlarda, yaşlılarda ve immün süpresif hastalarda ciddi tablolara neden olabilmektedir. Bu raporda, kullandığı ilaç nedeniyle hücrel immün sistemi baskılanmış bir hastada gelişen *L. monocytogenes* menenjitisi olgusu sunulmuştur.

Altmış dört yaşında erkek hasta baş ağrısı, bilinç bulanıklığı ve ateş şikayetleri ile acil servise başvurmuştur. Öyküsünden, glioblastoma multiforme teşhisiyle temozolomid ve IMRT (*Intensity Modulated Radiotherapy*) tedavileri aldığı anlaşılmıştır. IMRT tedavisinin 23. gününde şikayetlerinin başlaması üzerine acil servisimi-

ze getirilen hastanın fizik muayenesinde, ense sertliği ve meninks irritasyon bulguları saptanmıştır. Tam kan sayımında lenfopeni mevcuttur. Beyin BT'de akut patoloji görülmeyen hastaya LP yapılmıştır. BOS'un pürülan görünümde olması ve hücre sayımında 100 adet beyaz küre görülmesi üzerine, empirik olarak meropenem başlanmıştır. Laboratuvara gelen BOS örneğinden yapılan yaymada bakteri görülmemiştir. Ertesi gün, kültürde üreyen bakterinin gram-pozitif basil olması ve kanlı ağarda dar hemolizlerinin olması üzerine *L. monocytogenes* olabileceği düşünülmüştür. İzolat, MALDI TOF-MS (bioMérieux, Fransa) sistemi ile *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Bunun üzerine meropenem tedavisi kesilerek gentamisin ve ampisilin başlanmıştır. MALDI TOF-MS ile 24 saatten kısa bir sürede bakteri tanımlanarak, hastanın uygun tedavi alması sağlandı. Hastaya 21 gün intravasküler antibiyoterapi planlanmıştır. Tedavinin 10. gününde kendi isteğiyle hastaneden ayrılan olgunun, taburculuktan üç ay sonra, telefonla durumunun iyi olduğu öğrenilmiştir.

L. monocytogenes menenjitinin klinik bulguları, BOS bulguları, tedavisi ve prognozu diğer tip menenjitlerden farklıdır. Özellikle temozolomid gibi immün süpresif ilaç alanlarda menenjit etkeni olabileceği düşünülmelidir. Hastalığın prognozu açısından erken tanı ve tedavi son derece önemlidir.

Anahtar sözcükler: *L. monocytogenes*, menenjit

PP - 026

Üropatojenik *Escherichia coli* İzolatlarında Virülans Faktörleri ile Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Varlığının ve Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi

Kerem Yılmaz¹, Şafak Ermertcan¹, Hüseyin Taşlı¹, Semra Kurutepe²

¹Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

Amaç: İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) çocuklarda ve yetişkinlerde sık rastlanılan bakteriyel enfeksiyonlardandır. Akut İYE'nda *Escherichia coli* en sık izole edilen mikroorganizmadır.

Bu çalışmada pediatrik ve yetişkin hastalardan izole edilen üropatojenik *E. coli* kökenlerinde virülans faktörleri ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığının araştırılması ve bu kökenlerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında İYE olan hastalardan (45 çocuk, 38 yetişkin) izole edilmiş 83 üropatojenik *E. coli* kökeninin in-vitro antibiyotik duyarlılıkları Clinical Laboratory Standards Institute önerileri doğrultusunda modifiye Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile, GSBL varlığı ise kombine disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Virülans faktörlerinin belirlenmesi amacıyla ilgili genlerden *aer*, *adezin* kodlayan genlerden *pap* ve *sfa*, toksin kodlayan genlerden *cnf-1* ve *hly*'nin saptanması için multipleks polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır.

Bulgular: Antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde (Tablo I), erişkin hastalardan izole edilen kökenlerin direnç oranlarının, pediatrik hastalardan izole edilenlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. GSBL üreten kökenlerin oranı pediatrik hastalardan elde edilen izolatlarda %42, yetişkin hastalardan elde edilen izolatlarda ise %63 olarak saptanmıştır. Araştırılan virülans faktörlerinden *pap* geni her iki hasta grubunda da yüksek oranda saptanırken, *sfa* ve *cnf-1* genlerinin erişkin hastalardan izole edilen kökenlerde daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo II).

Sonuç: Çalışmamızda, *pap* geni taşıyan kökenlerde antibiyotik direnç oranlarının ve GSBL üretim oranlarının yüksek olması dikkat çekici bulunmuştur. Gelecekte, İYE patogenezinde önemli rolü olan *pap* gibi virülans faktörlerinin oluşumunu veya etkisini inhibe edecek ilaçların geliştirilmesinin, İYE tedavisinde yeni bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal duyarlılık, *E. coli* virülans faktörleri

Tablo I. Üropatojenik *E.coli* kökenlerinin antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Pedriatrik hasta	Yetişkin hasta
	Dirençli suş sayısı (%)	Dirençli suş sayısı (%)
AMC	19 (42)	20 (52)
CXM	25 (55)	30 (78)
KF	23 (51)	28 (73)
CIP	11 (24)	24 (63)
CN	16 (35)	21 (55)
SXT	30 (66)	24 (63)
CTX	18 (40)	24 (63)
CAZ	7 (15)	16 (42)
IPM	1 (2)	2 (5)
ATM	14 (31)	16 (42)
SAM	29 (64)	26 (68)

Tablo II. Üropatojenik *E.coli* kökenlerinde virülans genlerinin bulunma oranları

Gen	Pedriatrik hasta	Yetişkin hasta
	Sayı (%)	Sayı (%)
pap	29 (64)	24 (63)
sfa	7 (15)	11 (28)
cnf-1	9 (20)	12 (31)
aer	25 (55)	17 (44)
hly	8 (17)	8 (21)

PP - 027**İnsan ve Hayvan *Aeromonas* İzolatlarında Virülans İle İlişkili Genlerin Araştırılması**

Hanifi Körkoca¹, Yusuf Alan², Sedat Bozari³, Mustafa Berktaş⁴, Yaşar Göz⁵

¹Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, Muş

²Muş Alparslan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muş

³Muş Alparslan Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Anabilim Dalı, Muş

⁴Lokman Hekim Van Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van

⁵Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, Van

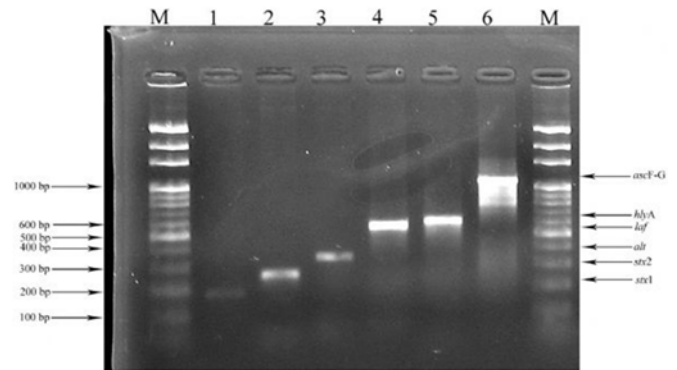
Aeromonas'lar gıda ve su ile bulaşan bakterilerdir. Ayrıca, bu bakterilerin zoonotik insan patojenleri olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, insan ve hayvan *Aeromonas* suşlarında virülans ile ilişkili genlerin varlığının araştırılması ve hayvan suşlarının insan enfeksiyonları açısından potansiyel önemlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, insanlardan izole edilen 16 ve hayvanlardan izole edilen 24 (11 martı, 7 balık, 3 koyun, 2 siğir ve 1 tavuk izolatı) olmak üzere toplam 40 *Aeromonas* suşunda virülans ile ilişkili *aerA*, *hlyA*, *alt*, *ast*, *laf*, *ascF-G*, *stx1* ve *stx2* genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır (Şekil). Agaroz jelde beklenen büyüklükte tespit edilen DNA fragmanları saflaştırılmış ve dizi analizleri yapılmıştır. Amplifiye ürünleri doğrulamak amacıyla NCBI BLAST kullanılmıştır. Araştırma sonucunda, *hlyA*, *alt*, *ascF-G*, *laf*, *stx2* ve *stx1* genleri insan suşlarında sırasıyla %6.25, %50, %0, %6.25, %0, %0 oranında; hayvan suşlarında ise sırasıyla %58.3, %20

.83, %33.3, %20.83, %8.33 ve %4.17 oranında tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirisinde *aerA* ve *ast* genleri bulunmamıştır. Yedi insan (%43.75) (6 klinik, 1 klinik olmayan izolat) ve 8 hayvan suşunda (%33.3) çalışmada araştırılan sekiz virülans geninden hiçbirisi saptanmamıştır. Hayvan türleri dikkate alındığında, koyun ve siğir izolatlarında sekiz virülans geninden hiçbirine rastlanmamış; tavuk izolatında yalnızca *hlyA* geni tespit edilirken, balık izolatlarında *hlyA* (%71.43), *alt* (%57.14), *ascF-G*(%71.43) ve *laf* (%28.57) genleri tespit edilmiştir. Aynı genlerin pozitiflik oranları martı izolatlarında sırasıyla %72.73, %9.09, %27.27 ve %27.27 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, virülans gen varlığının martı *Aeromonas* izolatlarında ilk defa araştırıldığı bu çalışmada, özellikle balık ve martı izolatlarında virülans gen varlığının insan izolatlarına göre önemli oranda yüksek olması, bu hayvanların insan *Aeromonas* enfeksiyonları açısından potansiyel önemlerini ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: *Aeromonas* spp., virülans geni



Şekil. Temsilci *Aeromonas* izolatlarında virülans genlerinin jel elektroforez görüntüleri [Kolon 1: *stx1* geni; Kolon 2-6: Sırasıyla *stx2*, *alt*, *laf*, *hlyA* ve *ascF-G* genleri; Kolon M: Moleküler ağırlık standardı (VC 100bp Plus DNA Ladder)].

PP - 028***Acinetobacter baumannii*'de Kolistine Direnç Gelişiminin Antibiyotik Duyarlılık Profili Üzerine Etkisi**

Mehmet Ramazan Ayaş, Burak Aksu, Zeynep Arzu İlki, Ufuk Hasdemir

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Acinetobacter baumannii özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda gelişen enfeksiyonlarda ilk sırada yer alan bir patojendir. *A.baumannii* dış ortama dayanıklılığı ve çoklu ilaç direnci sebebiyle ciddi mortalite ve morbidite nedenidir. 2012 yılında, T.C.S.B. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde yatan 210 farklı hastadan elde edilen 464 izolat ile *A.baumannii* en sık izole edilen mikroorganizmaların arasında yer almıştır. Bu izolatların %81'i karbapeneme dirençlidir. Kolistin, karbapenem grubu dahil çoklu ilaç direnci gösteren *A.baumannii* izolatlarının tedavisinde kullanılabilecek son seçenek ilaçlardan birisidir. Bu çalışmada, *A.baumannii*'de kolistine direnç gelişiminin antibiyotik duyarlılık profili üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, rutin antibiyogram testleriyle (E-test) kolistine dirençli *A.baumannii* üremesi saptanan 20 hastadan elde edilen 57 *A.baumannii* izolatı dahil edilmiş; kolistin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Kökenlerin %66'sı (n: 38) kolistine dirençli, %33'ü (n: 19) kolistine duyarlı bulunmuştur. Kolistine duyarlı ve dirençli köken izole edilen 10 hastaya ait toplam 37 izolatta Rep-PCR ile genetik tiplendirme yapılmıştır. Elde edilen Rep-PCR profillerinin değerlendirilmesiyle 5 majör genotip saptanmıştır. En yaygın olan genotip, 10 kökende gözlenmiştir. Sekiz hastada aynı genotipe ait olan duyarlı ve dirençli kökenler tespit edilmiş; 5 hastada tedavi sırasında kolistine duyarlı kökenlerin direnç kazandığı,

3'ünde ise kolistin direncinin ortadan kalktığı belirlenmiştir. Tedavi sırasında kolistin direnci geliştiren 5 izolatın ve kolistine dirençli iken duyarlı hale geçen 3 izolatın diğer antibiyotiklere ait zon çaplarındaki değişimler tabloda gösterilmiştir.

Sonuçlarımız, kolistine direnç gelişimi ile ilişkili bakteriyel hücre yüzey yapısı değişiminin, diğer antibiyotiklere olan duyarlılık profilini etkilediğini göstermektedir. Bu veriler, *A.baumannii* enfeksiyonlarında son seçenek ilaçlardan olan kolistine karşı direnç gelişimi söz konusu olduğunda, farklı bir antibiyotik ile tedavide başarı sağlanabileceğini desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, kolistin

Tablo. Antibiyogram profilinde değişim gözlenen kökenlere ait milimetrik değişimler*

Hasta no	Örn. No	Bölüm	Ömek	CO (MIK)	TZP	SAM	CAZ	CTX	FEP	IMP	MP	GEN	AN	NN
1	81	CYB	DTA	S	6 R	6 R	6 R		11 R	8 R		6 R	6 R	20 S
	99	CYB	Plevra	R	9 R	15 S	8 R		15 I	11 R		9 R	8 R	21 S
2	295	DYB	BA	S								8 R	9 R	19 S
	309	DYB	BA	R								7 R	8 R	14 S
3	284	DYB	Doku	S	8 R	8 R	7 R		12 R	7 R		9 R	8 R	16 S
	347	DYB	Kan	R	7 R	6 R	6 R		6 R	8 R		8 R	10 R	13 S
4	178	DYB	DTA	S			6 R	6 R	6 R	6 R		19 S	19 S	
	198	DYB	DTA	R			15 S	7 R	15 I	8 R		20 S	20 S	
5	280	DYB	Kan 1	S										13 S
	292	DYB	Kan 1	R										12 S
6	236	DYB	Kan	R	6 R	6 R	6 R		6 R	6 R		21 S		
	248	DYB	Balgam	S	10 R	8 R	12 R		14 R	7 R		22 S		
7	224	DYB	DTA	R			12 R		12 R			21 S	22 S	21 S
	298	DYB	DTA	S			6 R		6 R			19 S	13 R	18 S
8	515	DYB	DTA	R	6 R					7 R	6 R			19 S
	524	DYB	Kan	S	7 R					6 R	9 R			8 R

*Sadece antibiyogram profilinde değişim gözlenen kökenlere ait milimetrik değerler verilmiştir. BA: Batın içi apse; CYB: Cerrahi yoğun bakım ünitesi; DYB: Dahiliye yoğun bakım ünitesi; DTA: Derin trakeal aspirat; TZP: Piperasilin/Tazobaktam; SAM: Ampisilin/Sulbaktam; CAZ: Seftazidim; CTX: Sefotaksim; FEP: Sefepim; IMP: İmipenem; MP: Meropenem; GEN: Gentamisin; AN: Amikasin; NN: Tobramisin; R: Dirençli; I: Orta duyarlı; S: Duyarlı

PP - 029

Yoğun Bakım Ünitesinde Hastane Enfeksiyon Etkeni Olan *P.aeruginosa* and *A.baumannii* İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç ve Çapraz Bulaş Derecelerinin İncelenmesi

Zehra Yürüken¹, Latife İşeri², Özlem Ünal³, Rıza Durmaz⁴

¹Halk Sağlığı Laboratuvarı, Bursa

²Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara

⁴Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter baumannii* suşları, antibiyotiklere yüksek oranda direnç göstermeleri ve çevresel ortamlarda uzun süre canlı kalabilmeleri nedeniyle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar için önemli hastane enfeksiyonu etkenleridir.

Bu çalışmanın amacı, sekiz ay boyunca, yoğun bakım ünitesi hastalarından enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının çapraz bulaş ve antibiyotiklere direnç oranlarını belirlemektir.

Çalışmamızda, suşlar arasındaki klonal ilişkiler *pulsed-field* jel elektroforezi (PFGE) yöntemiyle; amikasin, seftazidim, gentamisin, imipenem, sefepim, piperasilin/tazobaktam, aztreonam ve meropenem direnç ise Clinical and Laboratory Standards Institute standartlarına göre, disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Yirmi altı hastadan izole edilen 33 *P.aeruginosa* suşu 18 pulsotip oluşturmuştur. İzolatların %50'si küme içerisinde yer almıştır. Üç veya daha az bant farkı kriterine göre çapraz bulaş oranı %63.6 olarak saptanmıştır. Kırk bir hastadan izole edilen 48 *A.baumannii* suşu 13 pulsotip oluşturmuştur. Kümeleşme oranı %85.4 olarak bulunmuştur. Kırk üç (%89.5) izolat epidemiyolojik olarak ilişkilidir. *P.aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranları %27 ile %39, *A.baumannii* izolatlarının %73 ile %92 oranları arasında bulunmuştur.

Bu çalışma, yüz elli yataklı bir hastanenin, hastane kökenli enfeksiyon etkenleri arasındaki direnç ve yüksek çapraz bulaş oranlarını göstermekte, uygulanan enfeksiyon kontrol programlarının yeniden ele alınmasının gerekliliğine dikkat çekmektedir.

Anahtar sözcükler: *A.baumannii*, *P.aeruginosa*

PP - 030

Eski ve Yeni Kullanıma Giren İki Hastanenin Yoğun Bakımlarından İzole Edilen *A.baumannii* İzolatları Arasındaki Klonal İlişki

Latife İşeri¹, Ümit Alanbay², Tuba Atalay¹, Özlem Ünal³, Rıza Durmaz⁴

¹Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

²T.C. Sağlık Bakanlığı, Siirt Devlet Hastanesi, Siirt

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara

⁴Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tüm dünyada görülen hastane enfeksiyonları etkenleri içinde *Acinetobacter baumannii* önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmanın amacı, yeni binaya taşınan Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde, iki binanın yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *A.baumannii* suşları arasındaki ilişkinin incelenmesidir. Her iki binanın yoğun bakımlardan izole edilen *A.baumannii* suşları arasındaki ilişki *pulsed-field* jel elektroforezi (PFGE) yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmaya, eski binaya ait 14, yeni binaya ait 31 olmak üzere toplam 45 *A.baumannii* suşu dahil edilmiştir. Toplam 22 pulsotip saptanmış olup, bunlardan 8'i küme oluşturan suşları içermektedir. Eski bina suşları 6 pulsotip oluşturmuştur. On bir suş (%78.5) üç farklı kümede yer almıştır. Bir suş bu kümelerin biri ile yakın bağlantılıdır; iki suş ise özgül PFGE profili göstermiştir. Yeni bina suşlarının %64.5'u (n: 20) bir kümede yer almış, 19 pulsotip saptanmıştır. Dört (%12.9) suşun eski bina izolatları ile aynı kümede yer aldığı belirlenmiştir. On altı suş (%51.6) onlarla yakın bağlantılı bulunmuştur. Sekiz suş kendi aralarında yakın, bir suş uzak bağlantılı (5, 6 bant farkı; %82 benzerlik) bulunmuştur. Bir suş özgül pulsotipe sahiptir.

Yeni binadaki yenidoğan yoğun bakım (YDYB) biriminden izole edilen 5 suştan 4'ü genel yoğun bakım (GYB) kökenlidir. Birisi eski, diğeri yeni bina suşlarının kümelerinde yer almıştır. İki binanın yakın bağlantılı bulunmuştur. Yeni binada GYB ile YDYB girişleri ve personel giyinme odası ortaktır.

Bu çalışma, hastane taşınırken eşya götürülmesi bile, hasta ve personel ile etken taşınmasına dikkat çekmekte, GYB'lar ve ayrı bir öne sahip YDYB'ların ortak noktası olmaması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, hastane enfeksiyonu

PP - 031

***Klebsiella* spp. İzolatlarının Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Yöntemi İle Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Dirençlerinin VITEK 2 Advanced Expert Sistem (AES) ile Belirlenmesi**

Alper Karagöz¹, Sümeyra Acar¹, Hanifi Körkoca²¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Referans ve Araştırma Merkezi, Ankara
²Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, Muş

Bu çalışmada, insan ve hayvan örneklerinden ve içme sularından izole edilen *Klebsiella* spp. izolatları VITEK/MALDI-TOF MS (BioMérieux, Fransa) ile tanımlanmış ve VITEK 2 AES otomatize sistemi (BioMérieux, Fransa) ile antimikrobiyal direnç paternleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Konvansiyonel yöntem ve MALDI-TOF MS ile tanımlama sonuçları farklı çıkan izolatlar, ayrıca 16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlanmıştır. 16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlama sonuçları VITEK MS ile elde edilen tanımlama sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Konvansiyonel yöntemle iki izolata *K. oxytoca* olarak yanlış tanımlandığı tespit edilmiştir. VITEK 2 AST-N261 kart ile izolatların %16.3'ünde, çift disk sinerji yöntemi ile izolatların %4.08'inde β-laktamaz üretimi saptanmıştır. Sonuç olarak, MALDI-TOF MS yönteminin *Klebsiella* türlerinin karakterizasyonunda hassas ve hızlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte BioMérieux AES otomatize sisteminin *Klebsiella* izolatlarında direnç paternini tespit etmede disk difüzyon yöntemine göre daha hassas bir laboratuvar yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Klebsiella*, MALDI-TOF MS

PP - 032

Karbapenemlere Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Direnç Genlerinin Araştırılması

Nuran Delialioğlu¹, Gül Bayram Abiha², Elif Vural Taşdemir¹, Gürol Emekdaş¹¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
²Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mersin

Enterobacteriaceae türlerinde karbapenem direncinde artış bildirilmektedir. Karbapenemler tedavide son seçenek antibiyotiklerdir ve nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Direncin temel mekanizması karbapenemazların oluşumudur. Karbapenemazlar; Ambler class A (KPC, GES ve SME), B (metallo-beta-laktamazlar) ve D (OXA-23, OXA-24-48, OXA-48, OXA-58) grubunda bulunan enzimleri içermektedir. Bu çalışmada, karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 ve GES tipi karbapenemazların araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2013-Nisan 2014 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemlere dirençli 23 *K. pneumoniae* izolatı alınmıştır. İzolatların tanımlanması klasik biyokimyasal testler ve otomatize bakteri tanımlama cihazında (VITEK-2, bioMérieux, Fransa) yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri; Kirby-Bauer disk difüzyon testi ve otomatize sistem (VITEK-2, bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Suşlara CLSI tarafından önerilen fenotipik yöntem modifiye Hodge testi uygulanmış ve OXA-48, GES-9 ve GES-11 gen bölgeleri multipleks PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu dönemde toplam 512 hastadan 672 *K. pneumoniae* suşu izole edilmiştir. Bunların 618'i (%91.9) imipenem ve meropeneme duyarlı, 6'sı imipenem ve 5'i meropeneme orta duyarlı, 48'i (%7.1) imipenem ve 49'u (%7.2) meropenem ve ertapenem dirençli olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan 23 *K. pneumoniae* izolatının modifiye Hodge testi ve OXA-48 gen bölgesi pozitif olarak bulun-

muştur. Bu izolatlarda GES-9 ve GES-11 gen bölgelerinin varlığı saptanmamıştır.

Sonuç olarak, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 pozitifliği saptanmıştır. *Enterobacteriaceae* türlerinde artan karbapenem direnci ciddi klinik bir problemdir. Moleküler çalışmalarla direnç mekanizmalarının izlenmesi ve uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Karbapenem direnci, *K. pneumoniae*

PP - 033

AIDS'li Hasta Balgamından İzole Edilen ve MALDI-TOF MS ile Tanısı Konan *Bordetella bronchiseptica* Trakeobronşiti

Salih Maçın¹, Fatma Nur Akdoğan¹, Ahmet Çağkan İnkaya², Şehnaz Özyavuz Alp², Serhat Ünal², Yakut Akyön Yılmaz¹¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Bordetella bronchiseptica, zorunlu aerob, gram-negatif pleomorfik bir kokobasildir. Kedi, köpek ve domuz gibi memeli hayvanlarda enfeksiyona neden olduğu belirlenmiştir. İnsanlarda ise özellikle küçük çocuklarda, alta yatan hastalığı bulunanlarda ve immün sistemi baskılanmış HIV ile enfekte bireylerde *B. bronchiseptica* enfeksiyonu, sağlıklı bireylere göre daha ağır seyretmektedir. Bu hastalarda *B. bronchiseptica*'nin disemine enfeksiyon, kaviter pnömoni ve nadiren de fatal trakeobronşit veya septisemiye neden olduğu belirtilmiştir.

On beş yıldır kliniğimizde akkiz immün yetmezlik sendromu nedeniyle takip edilen 47 yaşında erkek hasta, 4 haftadır devam eden öksürük şikayetiyle başvurmuştur. Fizik muayenesinde vücut sıcaklığı 37°C, nabız: 100/dk, mukozalar soluk, sağ pupilde katarakt, maksiller bölgede lipodistrofik değişiklikler saptanmıştır. Solunum sesleri kaba bulunmuştur. Lököpenik olan hasta febril nötropeni olarak kabul edilmiştir. Ampirik tedavi olarak meropenem başlanmış ve hastanın kronik öksürük şikayeti düzelmiştir. Servise yatışını takiben ateşi yükselen hastanın ateş odağı araştırılmış; kan ve idrar kültüründe üreme saptanmamıştır. Alınan boğaz kültürü %5 koyun kanlı agar ekilip 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Mikroskopik incelemede gram-negatif kokobasiller görülmüştür. Üreyen koloniler MALDI-TOF VITEK MS (bioMérieux, Fransa) sistemi ile değerlendirilmiş ve izolat *B. bronchiseptica* olarak tanımlanmıştır. Hastanın ateş kontrolü sağlanmış, meropenem tedavisi 7. günde kesilerek oral klaritromisine geçilmiştir.

B. bronchiseptica enfeksiyonu HIV ile enfekte bireylerde kronik öksürük ve trakeobronşite neden olabilmektedir. Tanısı ve antibiyotik duyarlılığı yapılmadığında fatal olabilmektedir. Kültür ve direkt immüno floresans (DFA) yöntemlerinin duyarlılığı düşük, PCR'ın ise duyarlılığı yüksek fakat maliyetli olması nedeniyle, HIV hastalarında fırsatçı bir patojen olan *B. bronchiseptica*'nin saptanmasında MALDI-TOF VITEK MS yönteminin başarılı olduğu ve patojenin erken tanısını sağladığı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Bordetella bronchiseptica*, AIDS

PP - 034

Acinetobacter baumannii Suşlarının Pulsed Field Gel Elektrofrezisi (PFGE) İle Tiplendirilmesi

Şengül Özkan¹, Dilek Güldemir², Alper Karagöz², Rıza Durmaz³

¹Dr. Sami Ulus Kadın Doğum ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara
²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkezi Laboratuvarı, Ankara
³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: *Acinetobacter baumannii* hastanelerde özellikle de yoğun bakım ünitelerinde mortalite ve morbiditeyi artıran, hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Bu mikroorganizma, pnömoni, bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonu, yara enfeksiyonu ve menenjit gibi fırsatçı enfeksiyonlardan izole edilebilir. Bu çalışmanın amacı; Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi klinik mikrobiyoloji laboratuvarında 2012 yılında incelenen 7 *A.baumannii* izolatının, klonal ilişkilerini ve epidemiyolojik özelliklerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: *A.baumannii* izolatlarının tanımlanması ve antibiyotik paternleri Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) sistemi ile yapılmıştır. Bu çalışmada antimikrobiyal ajan olarak Vitek 2 nonfermenter kartı kullanılmıştır. İzolatlar arasındaki klonal ilişki PFGE yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Tüm *A.baumannii* izolatları kolistine duyarlı bulunmuş ve kolistin, en etkili antimikrobiyal ajan olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, tüm izolatların amikasin ve sefoperazon/sulbaktam orta duyarlı-duyarlı olması dışında, test edilen diğer antibiyotiklere dirençli oldukları belirlenmiştir. *A.baumannii* izolatlarının *Apal* enzimi ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE yöntemi ile ortak tek bir klon saptanmıştır.

Sonuç: Verilerimiz, *A.baumannii* izolatlarının hastanemizde oldukça yaygın olduğunu göstermiş, bu bakterinin neden olduğu çevresel kaynaklı çapraz bulaş moleküler yöntemler ile doğrulanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, pulsed field jel elektrofrezisi

PP - 035

Ülkemizde İmal Edilen Hazır Besiyerlerinin Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Antibiyogramı Yönünden Kalite Değerlendirilmesi

Şengül Özkan, Yasemin Büzkaya

Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında iyi çalışan bir mikrobiyoloji laboratuvarı büyük rol oynar. Daha kaliteli sonuçlar verilebilmesi için, kullanılan besiyerlerinin performansı büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve antibiyogramı için değişik firmalar tarafından Türkiye'de imal edilen hazır besiyerlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, Salubris (Salubris A.Ş., İstanbul), Hymedia (Kudret Kimya A.Ş., İstanbul), Or-Bak (Alkim Ltd.Şti) ve GBL (Gül Biyoloji Laboratuvarı, İstanbul) markalarına ait hazır besiyerleri kalite kontrol suşları ile test edilmiştir. Ülkemizde imal edilen Mueller-Hinton (MH) besiyerlerinin kalite kontrol değerlendirilmesinde, karşılaştırmak için HETA (Heta Diagnostik, Ankara) marka hazır MH besiyeri ve BD (Becton, Dickinson and Company, ABD) marka antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Tüpte hazırlanmış olan hazır besiyerlerinin kalite değerlendirilmesi ise, hastanemizde BD marka toz besiyerinden hazırlanan besiyerleri kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmamızın verileri, Salubris marka hazır koyun kanlı ve EMB besiyerinin daha uygun olduğunu; GBL marka koyun kanlı besiyerinde streptokokların hemolizlerinin yeterince oluşmadığını; Hymedia marka toz ile hazırlanan besiyerlerinin ise koloni morfolojisi yönünden istenilen verimi sağlayamadığını göstermiştir. Bu bulgular ve

diğer besiyerlerinin kalite kontrol değerlendirilmesi ile ilgili ayrıntılı açıklamalar posterde yer almaktadır.

Sonuç olarak, enfeksiyon etkenlerinin doğru tanı ve uygun tedavisi için, mikrobiyoloji laboratuvarının kritik öneme sahip olduğu unutulmamalıdır. Dolayısıyla, düşük maliyet dikkate alınarak, amaca yönelik olmayan ya da iyi performans göstermeyen besiyerlerinin kullanımından vazgeçilmesi, besiyeri üreten firmaları daha kaliteli ürünler sunmaya teşvik edecektir.

Anahtar sözcükler: Hazır besiyeri, kalite kontrol

PP - 036

Kan Kültürlerinden İzole Edilen Escherichia coli Suşlarının Filo-Gruplandırılması

Hamit Kaan Müştak¹, İnci Başak Kaya¹, Merve Özdal¹, Nüket Bilgen², Ayşe Gülşen Haşcelik³, Kadir Serdar Diker¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

İnsan ve hayvan bağırsak florasında kommensal olarak bulunan *Escherichia coli*, bağırsak ve bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *E.coli* suşları *arpA*, *chuA*, *yjaA* ve bir DNA fragmanı TspE4.C2'nin kombinasyonlarına göre ekolojik özellikleri, virülans faktörleri ve antibiyotik direnç profilleri açısından farklılık gösteren 7 (A, B1, B2, C, D, E ve F) filogrupa ayrılmaktadır. Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *E.coli* suşlarının filo-gruplandırılması amaçlanmıştır. Kan kültürlerinden etken olarak izole edilen 162 *E.coli* suşunun filo-gruplandırılması kuadrupleks-PCR yöntemiyle yapılmıştır. Filo-gruplandırılmayan suşların 16S rRNA genleri sekanslanarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir.

Filo-gruplandırma sonucunda, en fazla B2 (n: 36; %22.22) ve F (n: 30; %18.51) filo-grupları bulunurken, bunu A (n: 3; %1.85) ve B1 (n: 1; %0.61) filo-grupları izlemiştir. Bunun yanı sıra 39 (%24.07) suş *Clade I* veya *II* olarak gruplandırılırken, 53 (%32.71) suş gruplandırılmamıştır. Gruplandırılmayan bu suşların 16S rRNA gen sekanslarının istatistiksel analizi ve bootstrap (1500) temelli filogenetik analizleri belirgin olmayan dallanma topolojisi göstermiştir. Bu nedenle, 16S rRNA'nın filo-gruplandırılmayan *E.coli*'lerin gruplandırılmasında yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre izolatların çoğunun bağırsak dışı patojenik *E.coli*'lerin gruplandırıldığı B2 ve F (B2'nin kardeş grubu) gruplarına dahil olduğu belirlenmiştir.

Escherichia coli kan izolatlarının çoğunlukla bağırsak dışı suşları içerdiği düşünüldüğünde, filo-gruplandırmanın doğru ve valide bir yöntem olduğu, *E.coli* suşlarının kökeni ve epidemiyolojisinin anlaşılmasında etkin olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli*, filogrup

PP - 037

Yayma Negatif Örneklerde Tüberküloz Tanısında Gerçek Zamanlı PCR Yönteminin Performansının Değerlendirilmesi

Ayşe Aynalı¹, Tuba Öztürk¹, Buket Cicioğlu Arıdoğan¹, Emel Sesli Çetin¹, Süleyman Önal¹, Esra Çiftçi¹, Selçuk Kaya²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta

²İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

Amaç: Ciddi bir enfeksiyon hastalığı olan tüberkülozun kesin tanısı bakteriyolojik yöntemlerle konulmaktadır. Bu çalışmada, mikobakteri kültürü altın standart kabul edilerek, yayma negatif örneklerde gerçek zamanlı (Rt)-PCR yönteminin *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) saptayabilme performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, Haziran 2010-Aralık 2013 tarihleri arasında, tüberküloz ön tanısıyla laboratuvarımıza gönderilen çeşitli örneklerden elde edilen sonuçlar retrospektif olarak incelenmiştir. Yaymalar Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemiyle boyanarak değerlendirilmiştir; tüm örnekler Löwenstein-Jensen ve BACTEC MGIT 960 (BD, ABD) besiyerlerine ekilmiştir. Örneklerde MTBC varlığı, ayrıca Rt-PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, 780 mide açlık sıvısı, 258 balgam, 60 idrar, 23 plevra sıvısı, 16 periton sıvısı, 12 abse, 7 doku, 5 BOS, 4 BAL, 3 perikard sıvısı, 2 eklem sıvısı ve 5 diğer olmak üzere toplam 1.175 örnek değerlendirilmiştir. Örneklerin 1.094'ü (%93.1) çocuk, 81'i (%6.9) yetişkin (56 erkek, 25 kadın) hastalardan alınmıştır. Yayma negatif bulunan örneklerden kültür yöntemi ile 12 (%1) MTBC izole edilmiştir. Üç (%0.2) örneğin sonucu kültür ve PCR pozitif; 9 (%0.8) örneğin sonucu kültür pozitif, PCR negatif olarak saptanmıştır. Kültür referans yöntem olarak alındığında Rt-PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif pediktif değerleri sırasıyla %25, %100, %100, %99.2 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Rt-PCR yönteminin yayma negatif örneklerde tüberküloz tanısında duyarlılığının istenilen düzeyde olmaması ile birlikte, klinik örneklerde tüberkülozun hızlı tanısında yararlı bir test olarak kullanılabilmesinin de göz ardı edilmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Gerçek zamanlı PCR, tüberküloz

PP - 038

Saha Örneklerinden Direkt *Salmonella* Tanısında Gerçek Zamanlı PCR Sisteminin (BAX®) Özgüllük ve Duyarlılığının Değerlendirilmesi

Özlem Şahan, Ebru Torun, Şebnem Mete, Hamit Kaan Müştak, Mehmet Akan, Kadir Serdar Diker

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

İnsan ve hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan *Salmonella*'ların teşhisinde konvansiyonel yöntemlere alternatif olabilecek hızlı ve ucuz moleküler tanı yöntemleri bulunmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de kanatlılarda sık görülen ve/veya epidemiyolojik açıdan önem taşıyan *Salmonella* serotiplerinin teşhisinde, BAX® (DuPont), otomatize gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) sisteminin özgüllük ve duyarlılığı *Salmonella* spp. kiti kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, Rt-PCR BAX® sisteminin özgüllüğünü belirlemek amacıyla, Kauffmann-White-Le Minor şemasına göre serotiplendirilmesi yapılmış, *Salmonella* serotiplerinin beyin-kalp infüzyon buyyonu (BHIB)'nda kültürleri hazırlanmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kit prosedürüne göre örnekler sisteme yüklenmiştir. Süre sonunda RT-PCR BAX® sistemi, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Liverpool*, *S. Mbandaka*, *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Heidelberg*, *S. Rissen*, *S. Stuttgart*, *S. Papuana* ve *S. Tennessee* serotiplerini, *Salmonella* spp. olarak saptamıştır. Sistemin duyarlılığını belirlemek için, seçilen *Salmonella* serotiplerinin on katlı seri sulandırılmaları (10⁻¹-10⁻⁸ cfu/ml) hazırlanarak, her bir sulandırım 25 gr kümes altlığıyla karıştırılmış ve altlığın ön zenginleştirilmesi yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her örneğin ön zenginleştirme sıvısından 10 µl alınıp 500 µl BHIB'na eklenerek 2-3 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler sisteme yüklenmiştir. Sistem, süre sonunda kontamine altlık materyalinde, 9 cfu/g *Salmonella*'yı tespit etmiştir. Sonuç olarak, Rt-PCR BAX® sisteminin kontamine saha örneklerinde *Salmonella* tanısında kullanılabilmesi kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Gerçek zamanlı PCR, *Salmonella*

PP - 039

Kıyma Örneklerinden İzole Edilen Koliform Grubu Bakterilerin Antibiyotik Direnci ve İntegraz Gen Varlığının Saptanması

Ceren Yavuz¹, Tuba Yıldırım¹, Belgin Sırken², Tuğçe Saat¹

¹Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Amasya

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

Giriş: Antibiyotiklerin tarımda, hayvan yetiştiriciliğinde ve klinik olarak uygunsuz kullanımı birçok bakterinin antimikrobiyal maddele direnç kazanmasına neden olmakta ve bu dirençli genlerin transpozon, plazmid ve integron gibi hareketli genetik elementlerle hayvanlardan insanlara geçişinde hayvansal kökenli gıdalar oldukça önemli rol oynamaktadır. İntegronlar, içerdikleri gen kasetleri yoluyla hareket edebilme yeteneğine sahip olurlar. Koliform grubu bakteriler gıdalarda hijyen indikatörü olmaları nedeniyle önem taşımaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, Amasya ilinde tüketime sunulan 50 adet kıyma örneğinden, özel bir besiyerinde (Violet Red Bilee Lactose Agar) izole edilen 50 koliform (*E.coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* spp) izolatı değerlendirilmiştir. İzolatların antibiyotik direnci (ampisilin, sefotaksim, seftriakson, kloramfenikol, gentamisin, nalidiksik asit, streptomisin, tetrasiklin) disk difüzyon yöntemiyle, integraz (*IntI*) gen varlığı ise PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

Bulgular: Koliform izolatlarında antibiyotik direnç oranının %76 (38/50) olduğu ve ampisilin (%64), streptomisin (%58) ve tetrasiklin (%50) antibiyotiklerine karşı yüksek direnç gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca 15 (%30) izolatın da 4-7 adet antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdikleri belirlenmiştir. İntegraz geni izolatların %34.21'inde (13/38) tespit edilmiştir. Bu gen, %10.52 (4/38) oranı ile beş antibiyotiğe (ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, streptomisin ve tetrasiklin) en yüksek direnç gösteren bakterilerde saptanmıştır.

Sonuç: Gıdaların koliform bakteriler ile yüksek oranda kontamine olması, o ürünün hijyenik kalitesinin kötü olduğunu ve bu gıdaların insanlar tarafından tüketiminin risk oluşturabileceğini göstermektedir. Çalışmamızın verileri, kıyma örneklerinin antibiyotiklere dirençli koliform bakteriler ile kontamine olduğunu ve mobil genetik elementlerden integrona sahip olabilme potansiyelini ortaya koymuş; antibiyotik direnç genlerinin, bu bakterileri içeren gıdalarla insanlara ve çevreye yayılabileceğini ve halk sağlığını bu yönüyle de tehdit edebileceğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Koliform, antibiyotik direnç, integraz

PP - 040

Bir Üçüncü Basamak Eğitim Hastanesi Klinik *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Mupirosin ve Fusidik Asit Direnç Prevalansı

Tuğrul Hoşbul, Bayhan Bektöre, Mustafa Özyurt

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

Amaç: Mupirosin ve fusidik asit, stafilokokal cilt enfeksiyonlarının tedavisinde ve *Staphylococcus aureus*'un burun taşıyıcılığının ortadan kaldırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. *S.aureus* suşlarında fusidik asit ve mupirosin direncinin sıklığı makul bir düzeydedir. Ancak dünya genelinde mupirosin ve fusidik asit direnç oranları değişmektedir. Bu çalışmanın amacı, bir üçüncü basamak eğitim hastanesinde klinik *S.aureus* izolatlarına karşı mupirosin ve fusidik asidin in vitro aktivitesini saptamaktır.

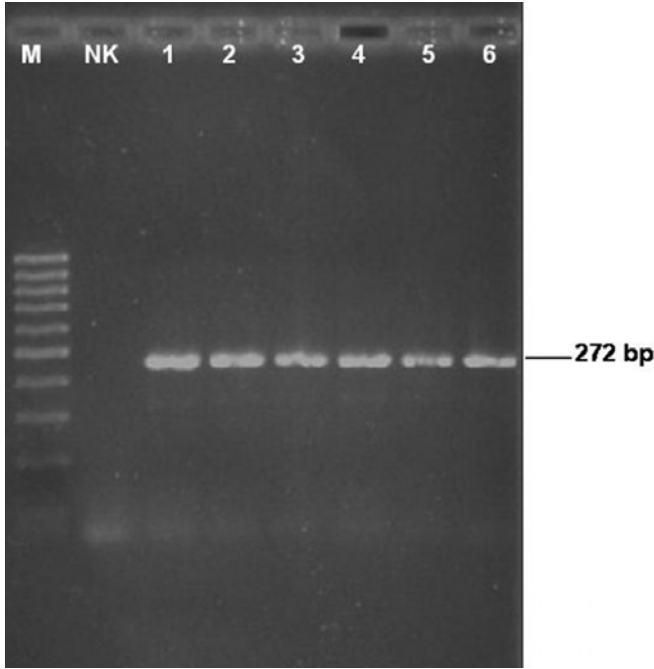
Gereç ve Yöntem: Ocak 2006-Aralık 2010 tarihleri arasında bir üçüncü basamak eğitim hastanesinde izole edilen 162'si metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA), 231'i metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) olmak üzere toplam 393 *S.aureus* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlar yüksek düzey mupirosin direnci için CLSI rehberliğinde 200 µg'lık mupirosin diski ile ve fusidik asit direnci için Europe-

an Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing kriterlerine göre 10 µg'lık disk ile test edilmiştir. Yüksek düzey mupirosin direnci ayrıca *ileS2* genine yönelik PCR ile doğrulanmıştır (Şekil).

Bulgular: Çalışmamızda mupirosin ve fusidik asit direnci sırasıyla %2.3 (9/393) ve %3.1 (12/393) olarak bulunmuştur. Mupirosin direncinin prevalansı MRSA için %4.9 (8/162), MSSA için %0.4 (1/231) olarak saptanmıştır. Fusidik asit direnç oranları MRSA için %6.2 (10/162), MSSA için %0.9 (2/231) şeklinde belirlenmiştir.

Sonuç: Hastanemiz *S. aureus* suşlarında, mupirosin ve fusidik aside karşı dirençte düşük prevalans değerleri saptanmıştır. Mupirosin direnci için 200 µg'lık diskin kullanıldığı disk difüzyon metodu PCR sonuçları ile iyi korelasyon göstermiştir. Düşük direnç oranlarının sürdürülmesi için *S.aureus* duyarlılık paternlerinin sık izlemi ve akılcı antibiyotik kullanımının dahil olduğu enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasının önemli olduğu kanısındayız.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*, yüksek düzey mupirosin direnci



Şekil. *ileS2* direnç geni için jel görüntüsü (M: Moleküler büyüklük belirteci; NK: Negatif kontrol).

PP - 041

Kırşehir İlinde İzole Edilen Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Oluşturan *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.* ve *Pseudomonas spp.* Suşlarında TEM, SHV, CTXM, OXA ve IBC Enzim Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Tanımlanması

Gülnur Tarhan¹, Tülin Demir², Serdar Tuncer³, Mümtaz Dadalı⁴, Özkan Görgülü⁴

¹Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman
²T.C. Sağlık Bakanlığı, Kırşehir İli Kamu Hastaneler Birliği, Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kırşehir
³Metiş Biyoteknoloji ve Dış Ticaret Ltd.Şti, Ankara
⁴Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kırşehir

Çalışmamızda Ocak 2009-Aralık 2011 tarihleri arasında Kırşehir İli Kamu Hastaneler Birliği Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Mikrobiyoloji Laboratuvarında, poliklinik ve farklı ünitelerinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilmiş ve fenotipik yöntemler (çift disk sinerji, E test) ile geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli olduğu saptanan 300 *E.coli*,

130 *Klebsiella* (88 *K.pneumoniae*, 42 *K.oxytoca*), 100 *Paeruginosa* ve 23 *Enterobacter* (20 *E.cloacae*, 3 *E.aerogenes*) olmak üzere toplam 553 adet GSBL pozitif izolatta polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile TEM, SHV, CTXM, OXA ve IBC beta-laktamaz genlerinin varlığı ve raman mikrospektroskopisi yöntemi ile GSBL alt tipleri ve epidemiyolojik ilişkileri incelenmiştir. PCR sonuçlarına göre, tüm izolatlarda *blaTEM* (%49.36) ve *blaCTX-M* (%52.62) geni yüksek oranda bulunurken, *blaIBC* saptanmamıştır. Bakteri kökenlerine göre yapılan değerlendirmede, en yüksek *blaTEM* (%69.33) ve *blaCTX-M* (%79.33) oranı *E.coli* izolatlarında saptanırken, en düşük oran *Paeruginosa* izolatlarında (%1) tespit edilmiştir. *Paeruginosa* izolatlarının hiç birinde *blaOXA* geni saptanmamıştır. En yüksek *blaSHV* geni oranı ise *K.pneumoniae* (%57.95) kökenlerinde bulunmuştur. *Paeruginosa* izolatlarında bu gen için pozitiflik oranı %1'dir. *E.cloacae* ve *E.aerogenes* kökenlerinde *blaTEM* oranı sırasıyla; %20 (4/20) ve %66.66 (2/3) iken, bu kökenlerde *blaSHV*, *blaCTX-M* ve *blaOXA* gen bölgesi saptanmamıştır. Çalışmamıza 165 *E.coli* izolatında *blaTEM* ve *blaCTX-M* genlerinin her ikisi de pozitifdir. Seksen sekiz *K.pneumoniae* kökeninin 1'inde idört 4 gen bölgesi de (*blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaOXA*) pozitif bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, PCR

PP - 042

Nocardia Türlerinin Tanımlanmasında Konvansiyonel Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması

Mahmut Celalettin Uner¹, Ayşe Gülşen Hasçelik¹, Hamit Kaan Müştak²

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
²Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Nocardia türleri doğada saprofit olarak bulunan, insanlarda ve hayvanlarda lokal ve yaygın enfeksiyonlara neden olan gram-pozitif, dallanan basillerdir. *Nocardia* türlerinin konvansiyonel biyokimyasal tanımlanmasında adenin, kazein, tirozin, ksantin ve hipoksantin, aril sülfataz varlığı, ramnozdan asit oluşturma gibi testler kullanılmaktadır. Son yıllarda giderek artan yeni türlerin eklenmesi ve çoğu türlerin non-reaktif olmaları nedeniyle biyokimyasal testlerin tek başına güvenilir olmadığı, günümüzde *Nocardia* türlerinin doğru ve kesin tanısında moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiği belirtilmektedir. Bu çalışmada *Nocardia* türlerinin tanımlanmasında konvansiyonel biyokimyasal yöntemler ile moleküler yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, 2002-2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarına gelen örneklerden izole edilen 45 *Nocardia* izolatı kullanılmıştır. Biyokimyasal tanımlamada; lizozim direnci, kazein, ksantin, hipoksantin tirozin hidrolizi, aril sülfataz varlığı ve karbonhidrat kullanım testleri uygulanmıştır. Tür düzeyinde tanımlama 16S rRNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal tanımlama sonrası, 45 izolat içerisinde 12 izolat *N.farcinica* 4 izolat *N.otitidiscaviarum* olarak tanımlanmıştır. Bunun dışında kalan 29 izolatın tür ayrımı yapılamamış, ancak *N.brevicatena*, *N.paucivorans*, *N.asteroides* Tip I veya Tip VI olabileceği sonucuna varılmıştır. Moleküler yöntem ile 26 izolat *N.cyriacigeorgica*, 12 izolat *N.farcinica*, 4 izolat *N.otitidiscaviarum*, 2 izolat *N.asteroides* ve 1 izolat *N.abscessus* olarak tanımlanmıştır.

Sonuç olarak, *Nocardia* türlerinin tanımlanması için konvansiyonel biyokimyasal testlerin yeterli olmadığı, bazı türleri yanlış tanımlayabildiği, kesin tanı için moleküler testlerle ayırım yapılması gerektiği anlaşılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Nocardia*, tür tanımlaması

PP - 043

Çevresel Kaynaklı Bir *Acinetobacter* İzolatında Ampisilin veya Kadmiyum Varlığında Meydana Gelen Makromoleküler Değişiklikler

Tuğba Kanat, Ayşe Gül Gözen, Feride Severcan

ODTÜ, Biyolojik Bilimler, Ankara

Amaç: *Acinetobacter* türleri doğada yaygın olarak bulunan gram-negatif bakterilerdir. Bu fırsatçı patojenler çok yönlü yapılarından dolayı biyo-iyileştirme, ağır metallerin biyosorpsiyon çalışmaları ve ötrofikasyonun kontrol altına alınması gibi farklı alanlarda kullanılırlar. Bu çalışmada, çevresel kaynaklı bir *Acinetobacter* izolatında, yaygın olarak kullanılan β -laktam grubu antibiyotiklerden ampisilin (Amp) ve yüksek toksisiteye sahip ağır metallerden kadmiyum (Cd) etkisi altında ortaya çıkan makromoleküler değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çevresel *Acinetobacter* izolatının Amp ve Cd için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri bulunmuştur. Bu MİK değerlerinin altındaki Amp veya Cd değerlerinde (<MİK) üretilen bakteriler, kontrol suşu ile karşılaştırılarak canlı bakteri hücrelerinde gerçekleşen makromoleküler değişiklikler, toplam yansıması azaltılmış-Fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTİR) spektroskopisi kullanılarak saptanmıştır. Deney ve kontrol suşlarının herbirisi için 10 ayrı replika kullanılmıştır. Elde edilen ATR-FTİR verileri tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edilmiş ve $p < 0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Çevresel *Acinetobacter* izolatının Amp ve Cd için MİK değerleri sırasıyla 600 $\mu\text{g/ml}$ ve 15.6 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. ATR-FTİR analiz sonuçlarına göre, 500 $\mu\text{g/ml}$ Amp varlığında özellikle hücre proteinlerinde istatistiksel olarak anlamlı yapısal değişiklikler tespit edilirken; 7.8 $\mu\text{g/ml}$ Cd varlığında üretilenlerde özellikle hücre zarı lipidlerinin dağılımında anlamlı değişiklikler bulunmuştur. Bunun yanı sıra kapsül ve hücre duvarı yapısında oluşan değişimler her iki grupta da öne çıkmıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, çevresel *Acinetobacter* izolatında Amp ve Cd'a karşı değişik direnç mekanizmalarının geliştirilmesi ile sonuçlanan farklı hücresel değişimlerin meydana geldiği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter*, ATR-FTİR spektroskopisi

PP - 044

Bir Çocuk Hastada BCG Aşısına Bağlı Gelişen Sternal Şişlik

Soner Sertan Kara¹, Meltem Polat¹, Yasemin Işık Koç², Anıl Tapısız¹, Arzu Okur³, Hasan Tezer¹, Meltem Yalınay Cırac², Çağrı Damar⁴, Erolcan Sayar⁵, Cengiz Çavuşoğlu⁶, Sedat Demircan⁷¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Onkoloji Bilim Dalı, Ankara⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, Ankara⁵Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara⁶Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir⁷Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara

Tüberküloz (TB), Bacille-Calmette-Guérin (BCG) aşısıyla önlenilebilen bir hastalıktır. BCG aşısı nadiren tedavi gerektiren, ciddi yan etkilere yol açabilmektedir. Bu raporda sunulan olgu, 16 aylık bir erkek hasta olup, göğüs ön duvarında 2 aydır olan şişlik nedeniyle hastanemize getirilmiştir. Olgumuz, zamanında, 3600 gr doğmuş, 2 aylıkken BCG aşısı yapılmıştır. Fizik incelemede sternum üstünde sert, fikse, 3x3 cm şişlik saptanmıştır (Resim). Bulaştırmalı durumu bilinmeyen bir TB hastasıyla 2-3 dakika teması olduğu öğrenilmiştir. Olgunun tüberkülin cilt testi negatiftir. Toraks tomografisinde TB bulgusu mevcut değildir. Manyetik rezonans görüntülemesinde (MRG) manubrium sterni üzerinde, 40x25x25 mm, ön mediastene uzanan destrüktif kitle saptanmıştır. İnsizyonel biyopsi ile alınan örnekte asido-rezistan basil (ARB) pozitif, kültür negatif

olarak saptanmış; gerçek zamanlı (Rt)-PCR ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) pozitifliği tespit edilmiştir. Histopatolojik incelemede mikobakteriyel enfeksiyon bulguları olan hastaya dörtlü anti-TB tedavi (izoniazid, rifampin, pirazinamid, etambutol) başlanmıştır. Bir ay sonraki değerlendirmede lezyonun büyüdüğü izlenmiştir. Kontrol MRG'de lezyonun ön mediastene, cilt altı dokuya ve sağ kostokondral bileşkeye ilerlediği görülmüştür. Tedaviye streptomisin eklenmiş ve hasta tekrar opere edilmiştir. Sarı renkli, 4.5x3.5x4 cm çaplı doku ve destrükte olmuş manubrium sterni çıkarılmıştır. Doku örneğinde ARB pozitif, kültür negatif ve histopatolojik inceleme bulguları mikobakteriyel osteomyelit ile uyumlu bulunmuştur. Rt-PCR ile MTC pozitifliği saptanmıştır. Altıtip analizinde DNA dizileme ve Hainlife Science Genotype MTBC kitiyle BCG bovis için tanımlayıcı olan 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10 ve 13 no'lu bantlar pozitif olarak tespit edilmiştir. Hastanın tedavisi, 2. ayın sonunda izoniazid ve rifampin olarak düzenlenmiştir. Kontrol muayenelelerinde aktif şikayeti olmayan, yara iyileşmesi devam eden hastanın tedavisinin toplam 1 yıla tamamlanması planlanmıştır.

Sonuç olarak, BCG aşısına bağlı sternal osteomyelit görülebileceği akılda tutulmalı ve TB hastalığı tanısı şüpheli olduğunda, aşılama hastalarında ileri alt tiplendirme yapılmalıdır.

Anahtar sözcükler: BCG, *Mycobacterium bovis*



Resimler. Lezyonun başvuru sırasındaki görüntüsü.

PP - 045

Yara Yerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biyofilm Oluşumunun Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi

Türkan Özdemir, Meltem Yalınay Çırak

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Bu çalışmada, yara yerinden izole edilen 50 *Staphylococcus aureus* suşunun fenotipik olarak biyofilm yapma ve genotipik olarak biyofilm oluşumunun ilk basamağında görev yapan yüzey proteinleri genlerinin varlığı (*fnbA*, *clfA* ve *ebpS*), ikinci basamak hücre adezyonunda görev alan *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığının araştırılması ile bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Biyofilm oluşumu fenotipik olarak, kongo kırmızılı agar besiyeri (KKAB) ve mikrotitrasyon plak yöntemi (MPY) kullanılarak karşılaştırılmıştır. KKAB değerlendirmesinde 16 suşta biyofilm oluşumu negatif, 34 suşta pozitifdir. MPY'de ise suşların 17'sinde zayıf, 21'inde orta derece ve 12'sinde güçlü biyofilm oluşumu saptanmıştır. Yöntemler istatistiksel olarak uyumlu bulunmamıştır ($p>0.05$). Biyofilm oluşumunun moleküler olarak değerlendirilmesinde, 50 suşun 44'ünde *fnbA* ve *clfA* geni saptanırken 6'sında saptanmamıştır. *ebpS* geni 23 suşta pozitif, 17'sinde negatiftir. KKAB biyofilm oluşumu ile *fnbA*, *clfA* genleri arasında normal-orta derecede ilişki ($p<0.001$), *ebpS* geni ile zayıf bir ilişki ($p>0.001$) bulunmuştur. MPY ile *fnbA* geni arasında zayıf derecede ($p>0.001$), *clfA* geni zayıf ($p>0.001$) ve *ebpS* geni ile negatif yönlü zayıf ($p>0.001$) bir ilişki saptanmıştır. Suşların 42'sinde *icaA* ve *icaD* genlerinin ikisi de saptanırken, 7'sinde *icaA* ve *icaD* genleri bulunmamıştır. Bir suşta *icaA* pozitif, *icaD* ise negatiftir. KKAB değerlendirmesi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında normal-orta derecede ilişki, MPY ile zayıf bir korelasyon saptanmıştır.

Sonuç olarak, *S.aureus* biyofilm değerlendirilmesinde kullanılan fenotipik yöntemler arasında standardizasyon saptanmamıştır. Moleküler değerlendirme, *S.aureus*'da biyofilm oluşumu için sorumlu tutulan (*fnbA*, *clfA*, *icaA* ve *icaD*) genlerle pozitif ilişkinin olduğunu ve *ebpS* ile negatif yönlü bir ilişkinin bulunduğunu, ancak biyofilm oluşumunun tek başına genotipik özelliklere bağlı olmayıp, çevresel ve suşa ait özelliklerin de biyofilm oluşum mekanizmalarını etkilediğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Biyofilm, *S.aureus*

PP - 046

Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Prevalansları ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Nagehan Paktaşçıl¹, Gamze Kaya², Öner Kipritçi¹, Zeynep Tamay², Nermin Güler², Hasan Nazik¹¹İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul²İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Amaç: Bu çalışmada, hastanemize başvuran kistik fibroz (KF)'lu hastalarının solunum yolu örneklerinde metisiline duyarlı (MSSA) ve dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) prevalansı ve antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 15 Nisan 2013 – 15 Nisan 2014 tarihleri arasında 97 KF hastasından alınan 371 solunum yolu örneği incelenmiştir. Örnekler %5 koyun kanlı Columbia agar, Chapman ve CHROMagar MRSA (Becton Dickinson, ABD) besiyerlerine ekilmiş, Chapman ve CHROMagar MRSA'daki üremeler için DNaz testi yapılmıştır. Chapman ve CHROMagar MRSA besiyerlerinde üreyen ve sefoksitin direnci saptanan suşların *mec* gen bölgesi, femB (tanımlama)-*mecA*-*mecC* multipleks PCR yöntemi ile araştırılmıştır. MSSA ve MRSA izolatlarının penisilin G, gentamisin, levofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), sefoksitin, teikoplanin,

eritromisin, klindamisin, telitromisin, linezolid ve tetrasikline duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda, 97 hastanın 67'sinden (%69) MSSA, 11'inden (%11.3) ise MRSA izole edilmiştir. On bir hastadan izole edilen toplam 15 MRSA suşunun tümü *mecA* pozitif, *mecC* negatif bulunmuştur. 119 MSSA izolatının %85'i penisiline, %24.4'ü eritromisine, %14.3'ü tetrasikline, %15'i klindamisine, %0.1'i telitromisine, %1'i SXT'ye, %2.5'i gentamisin ve levofloksasine dirençli bulunmuştur. Teikoplanin ve linezolidde direnç saptanmamıştır. MRSA suşlarının tamamı penisiline, %53.3'ü tetrasikline, %33.3'ü eritromisin, klindamisin ve levofloksasine, %47'si gentamisine, %27'si telitromisine dirençli bulunmuştur. Teikoplanin, linezolid ve SXT'ye direnç saptanmamıştır.

Sonuç: KF'lu hastalarda antibiyotiklere daha dirençli olmaları ve mortalite oranlarını artırmaları nedeniyle MRSA'nin hızlı/doğru tanısı ve tedavisi büyük önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Kistik fibroz, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

PP - 047

Mycobacterium tuberculosis Tanısında İki Farklı Gerçek Zamanlı PCR Yönteminin Değerlendirilmesi

Demet Timur, Ömür Mustafa Parkan, Hüseyin Kılıç, Mustafa Altay Atalay, Fatma Filiz Tekinşen, Ayşe Nedret Koç

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Amaç: *Mycobacterium tuberculosis* tanısında Ehrlich-Ziehl Neelsen (EZN) gibi aside dirençli boyama yöntemleri hızlı ve uygulaması kolay yöntemler olmasına rağmen kesin sonuç vermemektedir. Kültür yöntemleri altın standart olarak kabul edilmesine rağmen zaman alıcı yöntemlerdir. Nükleik asit amplifikasyon testleri ise kısa sürede sonuç vermeleri nedeniyle tüberkülozun hızlı tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, tüberküloz şüpheli klinik örneklerde Xpert MTB/RIF (Cepheid GeneXpert® System, CA) yöntemi ile *M.tuberculosis* RG PCR (QIAGEN GmbH; Almanya) yönteminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarına Ocak 2013-Aralık 2013 tarihleri arasında gönderilen 407 hastaya ait toplam 432 klinik örnek EZN yöntemiyle boyanmıştır. Örnekler N-asetil L-sistein-sodyum hidroksit (NALC-NaOH) yöntemiyle homojenize ve dekontamine edildikten sonra, BACTEC MGIT 960 kültür şişeleri ile eş zamanlı olarak Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerlerine ekim yapılmıştır. Nükleik asit amplifikasyon testi olarak 432 klinik örneğin 196'sında Xpert MTB/RIF yöntemi, 236'sında da *M.tuberculosis* RG PCR yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Toplam 432 klinik örneğin 8'i (%1.9) EZN yöntemi ile, 27'si (%6.3) kültür yöntemleri ile pozitif olarak bulunmuştur. Kültür yönteminin altın standart kabul edildiği bu çalışmada, EZN boyama yönteminin duyarlılığı %55.5, özgüllüğü %99.2 iken; *M.tuberculosis* RG PCR ve Xpert MTB/RIF yöntemlerinin duyarlılığı sırasıyla %53.8 ve %85.7; özgüllüğü sırasıyla %99.1 ve %97.9 olarak saptanmıştır.

Sonuç: Xpert MTB/RIF yöntemi ile *M.tuberculosis* RG PCR yönteminin tüberküloz tanısında yaklaşık olarak benzer özgüllüğe sahip olmasına rağmen, Xpert MTB/RIF yönteminin yüksek duyarlılığı dikkati çekmektedir. İmkanlar dahilinde yöntemlerin eş zamanlı olarak karşılaştırılmasının daha objektif sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, moleküler yöntemler

Karbapeneme Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında EUCAST Fenotipik Karbapenemaz Doğrulama Testinin Genotipik Test Sonuçları ile Uyumu

Onur Karatuna¹, Işın Akyar¹, Sinem Öktem Okullu¹, Nihan Ünübol¹, Deniz Ece Kaya¹, Eda Güngörürler¹, Sesin Kocagöz², Tanıl Kocagöz¹

¹Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Amaç: Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) karbapenemaz üreten kökenlerin saptanmasını enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı açısından önemli kabul etmekte ve bu kökenlerin saptanması için fenotipik testlere dayalı bir yöntem önermektedir. Çalışmamızda genotipik yöntemlerle karbapenemaz genleri belirlenmiş *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde karbapenemaz üretiminin saptanması için EUCAST önerileri ile alınan sonuçların genotipik test sonuçları ile uyumu araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Eylül 2011-Mart 2014 döneminde klinik örneklerden üretilen ve EUCAST tarama ölçütlerine göre karbapenemaz üretimi şüpheli olan 144 köken (28 *E.coli*, 115 *K.pneumoniae*, 1 *K.oxytoca*) karbapenemaz üretiminin doğrulanması için EUCAST'ın önerdiği yöntemle test edilmiştir. Bu amaçla, 10 ug meropenem diski tek başına ve ayrıca EDTA, dipikolinik asit, aminofenilboronik asit ve kloksasilin eklenerek test edilmiştir. Kökenler *IMP*, *VIM*, *NDM-1*, *KPC* ve *OXA-48* genleri için tasarlanan multipleks polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) testi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Multipleks PCR test sonuçlarına göre *OXA-48* geni 6 *K.pneumoniae* kökeninde bir metallo-beta-laktamaz (MBL) geni ile birlikte bulunmuştur. Bu 6 köken MBL fenotipi göstermiştir. Sadece *OXA-48* geni taşıdığı gösterilen 101 kökenin 97'sinde (%96) dirençten sorumlu beta-laktamaz *OXA-48* veya GSBL+porin kaybı olarak bulunmuştur. MBL geni içeren 25 kökenin (24 *NDM-1*, 1 *VIM*) tümü MBL fenotipi göstermiş, *KPC* geni içeren bir köken *KPC* fenotipi göstermiştir (Tablo).

Sonuç: EUCAST önerileri, çalışma kökenlerimiz için yüksek derecede uyum göstermişse de, testin *OXA-48* ve GSBL+porin kaybı fenotipi gösteren kökenleri birbirinden ayıramaması, testin karbapenemaz üretimi doğrulama testi olarak kabul edilmesini güçleştirmektedir. Ancak test ettiğimiz MBL ve *KPC* üreten kökenlerde fenotipik ve genotipik test sonuçları arasında %100 uyum saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: EUCAST, karbapenemaz

Tablo. EUCAST fenotipik karbapenemaz doğrulama testinin genotipik test sonuçları ile uyumu

Fenotip	Genotip				
	Negatif (n: 17)	OXA-48 (n: 107)	NDM-1 (n: 24)	VIM (n: 1)	KPC (n: 1)
Negatif	9	1	0	0	0
OXA-48/GSBL+porin kaybı	4	97	0	0	0
MBL	3	8	24	1	0
KPC	0	0	0	0	1
AmpC+porin kaybı	1	1	0	0	0

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; MBL: Metallo-beta-laktamaz

Çeşitli Hayvan Türlerinden İzole Edilen Vankomisine Dirençli Enterokok İzolatlarında *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* Genlerinin Moleküler Yöntemle Araştırılması

Devrim Sarıgüzel¹, Seçil Abay², Harun Hızlısoy², Fuat Aydın²

¹T. Komando Tuğayı, B Tipi Gıda Kontrol Müfrez Komutanlığı, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Amaç: Bu çalışmada, Kayseri bölgesindeki çeşitli hayvan türlerinin dışkı örneklerinde vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. varlığının incelenmesi, elde edilen izolatların antibiyotik dirençlerinin saptanması ve izolatlarda *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genlerinin moleküler yöntemle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Mayıs-Ağustos 2010 tarihleri arasında her birinden 100'er adet olmak üzere sığır, broyler, yumurtacı tavuk ve köpeğe ait dışkı örnekleri çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerden izolasyon ve tanımlama işlemi sonucu elde edilen enterokok suşlarının, disk difüzyon ve E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları ve glikopeptid direnci belirlenmiştir. *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genlerinin varlığı multipleks PCR (mPCR) ile araştırılmıştır.

Bulgular: Örneklerden elde edilen 68 izolatın 63'ü (%92.6) *E.faecium*, 3'ü (%4.4) *E.gallinarum* ve 2'si (%2.9) *E.casseliflavus* olarak tanımlanmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle izolatların 64'ü (%94) quinupristin/dalfopristine, 16'sı (%23.5) eritromisine, 16'sı (%23.5) tetrasikline, 9'u (%13.3) siprofloksasine, 7'si (%10.2) streptomisine, 10'u (%14.7) vankomisine ve 5'i (%7.3) teikoplanine dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon testi ile vankomisine dirençli bulunan 10 adet izolat ile teikoplanine dirençli 5 adet izolatın MİK değerleri E-test yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatların 32'sinin (%47) çoğul ilaç direncine sahip olduğu belirlenmiştir. mPCR ile hiçbir izolatın *vanA* ve *vanB* geni taşımadığı saptanmış, ancak 3 izolatın *vanC1* ve 2 izolatın *vanC2* geninin varlığı gösterilmiştir.

Sonuç: Türkiye'de çiftlik hayvanlarında avoparsin kullanımının yasaklanmasından sonra enterokoklarda glikopeptid direncinin düşük seviyede de olsa devam ettiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Antibiyotik direnci, *Enterococcus* spp.

Yoğun Bakım Hastalarının Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Enterococcus* spp. İzolatlarının Multipleks PCR İle Tanımlanması ve Virülans Genlerinin Araştırılması

Tuba Kayman¹, Seçil Abay², Bülent Bozdoğan³, Harun Hızlısoy², Fuat Aydın², Ahmet Gödekmerdan⁴, Barış Otlu⁵

¹Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

³Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

⁴Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

⁵İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Bu çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının moleküler düzeyde tanımlanması ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Mart 2012-Mart 2013 tarihleri arasında Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara ait kan kültürlerinden üretilen 149 adet *Enterococcus* spp. izolatı dahil edilmiştir. İzolatlar konvansiyonel yöntemler ve otomatize Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. Tür düzeyinde tanımlama için ayrıca multipleks PCR yönteminden yararlanılmıştır. Yine, izolatların, *aggregation substance* (*asa*), *collagen-binding protein* (*ace*), *cytolysin* (*cyl*), *Enterococcus faecalis endocarditis antigen* (*efa*), *enterococcal surface protein* (*esp*), *gelatinase* (*gel*), ve *hyaluronidase* (*hyl*) virülans faktörlerinin varlığı multipleks PCR ile araştırılmıştır.

İzolatların 77'si *E.fecalis* ve 72'si *E.faecium* olarak tanımlanmıştır. *E.fecalis* izolatlarının 52'sinde (%67.5) *asa*, 74'ünde (%96.1) *ace*, 31'inde (%40.3) *cyl*, 74'ünde (%96.1) *efa*, 54'ünde (%70.1) *esp*, 69'unda (%89.6) *gel* ve 3'ünde (%3.9) *hyl* virülans genlerinin varlığı saptanmıştır. *E.faecium* izolatlarının ise 14'ü (%19.4) *asa*, 4'ü (%5.6) *ace*, 5'i (%6.9) *cyl*, 8'i (%11.1) *efa*, 51'i (%70.8) *esp*, 41'i (%56.9) *gel* ve 26'sı (%36.1) *hyl* virülans genleri yönünden pozitif bulunmuştur. Test edilen virülans genlerinin pozitiflik oranları, genel olarak *E.faecalis* izolatlarında daha yüksek gözlenirken, antibiyotik direnç genlerinin aktarımında rol oynayan plazmidlerin transferini kolaylaştırdığı düşünülen *esp* gen varlığı, her iki türe ait izolatlarda da yakın değerlerde bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *Enterococcus spp.*, virülans genleri

PP - 051

Salmonella Infantis Tanısında Serotiplendirme ve 16S rRNA Dizi Analizi

Yörük Divanoğlu, Özlem Şahan, Hamit Kaan Müştak, Nurdan Karacan, Kadir Serdar Diker

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Salmonellozis, tüm dünyada ve ülkemizde oldukça yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır. Bu hastalığa neden olan *Salmonella* türlerinin ve serovarlarının çabuk ve doğru teşhisi hastalıkların tedavisi ve epidemiyolojilerini anlamak için oldukça önemlidir. *Salmonella* teşhisinde kullanılan konvansiyonel yöntemlerin 7-9 gün sürmesi, izolasyonun ardından biyokimyasal testlere ve serotiplendirmeye ihtiyaç duyulması, *Salmonella* teşhisinde hızlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. 16S rRNA dizi analizi uzun yıllardır bakteriyel nomenklatürde kullanılan temel yöntemlerden biridir. Türkiye'de kanatlı hayvanlardan en sık izole edilen *Salmonella* serovarının *Salmonella* Infantis olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, kanatlı hayvan altıklarından izole edilen *Salmonella* Infantis'in tanısında "altın standart" olan serotiplendirme ile 16S rRNA dizi analizi yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, ISO6579'a göre izole edilen ve Kauffmann-White-Le Minor şemasına göre serotiplendirilen 42 *Salmonella* Infantis izolatının dizi analizi, 16S rRNA operonuna özgül üniversal primerler (357F-1492R) kullanılarak yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda, 42 izolata ait yaklaşık 1.100 bp'lik 16S rRNA dizisi, Gen Bankasındaki dizilerle karşılaştırılarak *Salmonella* Infantis olduğu belirlenmiştir. Gen Bankasındaki diziler ile yapılan karşılaştırma sonucu maksimum ve total skorların birbirine eşit, "E-value" değerlerinin sıfır olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 16S rRNA dizi analizinin serotiplendirmeye alternatif, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Dizi analizi, *Salmonella*

PP - 052

Veteriner Klinik Örneklerde Direkt 16S rRNA Dizi Analizi İle Bakteriyel Tanı

İnci Başak Kaya, Nurdan Karacan, Merve Özdal, Şebnem Mete, Kadir Serdar Diker

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Konvansiyonel bakteriyolojik kültürün zaman alıcı olması ve üretimi zor olan bakterilerin yarattığı güçlükler nedeniyle, son yıllarda moleküler tanı yöntemleri ön plana çıkmıştır. Bakteri sınıflandırması ve adlandırması için kullanılan moleküler tanı yöntemleri arasında bulunan, bakteri kültüründen 16S rRNA dizi analizi en geçerli yöntemdir. Ancak izolasyonda karşılaşılan güçlükler ve zaman faktörü, klinik materyalden direkt 16S rRNA dizi analizinin kullanımını gündeme getirmiştir. Bu çalışmada, steril olan ve olmayan farklı hayvan klinik materyallerinden (eklem sıvısı, sperma, peritoneal

sıvı, meme içi sıvısı, karaciğer, akciğer, nazal sürüntü, idrar) sınırlı sayıda örnek alınarak direkt 16S rRNA dizi analizi ile ön araştırma yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, dizi analizi için 357F ve 1492R 16S rRNA'ya özgül primerler kullanılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen yaklaşık 1100 bp'lik 16S rRNA operonuna ait dizi Gen Bankasındaki diziler ile karşılaştırılmıştır. Steril örneklerde; *Mannheimia haemolytica*, *Fusobacterium necrophorum*, *Morganella morganii*, *Neisseria canis*, *Morexella canis*, *Enterococcus faecium*, *Histophilus somni*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas cedrina* gibi bakteri türlerinin varlığı saptanmıştır. Steril olmadığı düşünülen örneklerin bazılarında tek bir bakteri türü bulunurken, bazılarında da karışık bakteri olasılığı nedeniyle sekans sonucu alınamamıştır. Bu bulgular, direkt 16S rRNA analizinin, kontamine olmayan klinik materyalden kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle bir tanı yöntemi olarak değer taşıyabileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Direkt 16S rRNA dizi analizi, klinik materyal

PP - 053

Çok İlaç Dirençli M.tuberculosis İzolatlarının Genotiplendirilmesi

Ümit Alanbayı¹, Ahmet Arslantürk², Alper Karagöz³, Hülya Şimşek², Gülnur Tarhan⁴, Rıza Durmaz⁵

¹Siirt Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Siirt

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

⁴Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Kırşehir

⁵Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Çok ilaç dirençli (ÇİD) tüberküloz sorunu dünyada giderek yaygınlaşmaktadır. Tüberkülozda enfeksiyon zincirini kırmak ve kaynak ve bulaş yollarını saptamak için en değerli yöntemler moleküler tiplendirme yöntemleridir. Bu çalışmanın amacı, ÇİD *M.tuberculosis* suşları arasındaki klonal ilişkinin moleküler tiplendirme yöntemleriyle belirlenmesi, ülkemizdeki ÇİD *M.tuberculosis* suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin saptanması ve uygulanan tüberküloz tedavisi kontrol programlarının etkinliği hakkında laboratuvara dayalı verileri ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 52 ÇİD *M.tuberculosis* suşu alınmıştır. *M.tuberculosis* suşları Türkiye'nin farklı merkezlerinden 2008-2010 yılları arasında toplanmış ve Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Tüberküloz Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı stoklarında bulunan izolatlar arasından seçilmiştir. Suşlar arasındaki filogenetik ilişki spoligotiplendirme yöntemiyle belirlenmiştir. Çapraz bulaşı ortaya koymada 24 lokuslu *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeats* (MIRU-VNTR) yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Spoligotipleme profilleri çıkarılan suşlar, on beş farklı spoligotipi sergilemiş olup bunlardan 11 tanesi küme oluşturan suşları bulundurmaktadır. Toplam 48 suş (%92.3) küme içerisinde yer almıştır. MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirmesi yapılan 52 *M.tuberculosis* suşundan 49 farklı genotip saptanmıştır. Bu genotiplerden üç tanesi küme oluşturan suşları içermektedir. Toplam 6 (%11.5) suş küme içerisinde yer almıştır.

Sonuç: Çalışılan suşlar arasındaki çapraz bulaş oranı düşüktür. Spoligotiplendirme verilerine göre ülkemizde heterojen tüberküloz basil popülasyonu vardır. Bir taraftan tüm dünyada yaygın olarak gözlenen SIT53 ve yalnızca ülkemiz ve komşularımızda gözlenen SIT41 bulunurken, diğer taraftan suşların %5'den fazlası dünya veri bankasında bulunmayan özgü profiller sergilemektedir.

Anahtar sözcükler: Çapraz bulaş, filogenetik ilişki

PP - 054

Rifampisin ve Isoniazid Direncine Yol Açan Mutasyonların Karakterizasyonu

Ümit Alanbay¹, Ahmet Arslantürk², Alper Karagöz³, Hülya Şimşek², Gülnur Tarhan⁴, Rıza Durmaz⁵

¹Siirt Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Siirt

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

⁴Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Kırşehir

⁵Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Tüberkülozda direnç gittikçe artan global bir problemdir. Türkiye'de Verem Savaşı 2012 Raporu'na göre ilaç duyarlılık testi yapılan 4.965 olgunun 250'sinin (%5) çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz olduğu bildirilmiştir. *Mycobacterium tuberculosis*'de direnç mekanizmasının moleküler düzeyde irdelenmesi, hızlı tanı amacıyla geliştirilecek olan testlere temel bilgi oluşturması yanında, direnç seviyesi hakkında önemli bilgiler vermektedir. DNA dizi analizi referans yöntemdir. Bu yöntemle bilinen mutasyonlar yanında, önceden bilinmeyen mutasyonlar da saptanabilmektedir. Bu çalışmada, 52 ÇİD *M.tuberculosis* suşunda RIF ve INH direncinin moleküler mekanizmasının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: *M.tuberculosis* suşları Türkiye'nin farklı merkezlerinden 2008-2010 yılları arasında toplanmış ve Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Tüberküloz Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı stoklarında bulunan izolatlar arasından seçilmiştir. Seçilen 52 *M.tuberculosis* izolatının rifampisin ve isoniazid direnci agar proporsiyon yöntemiyle doğrulanmıştır. İncelenen izolatlarda *rpoB*, *katG*, *inhA* gen bölgelerindeki mutasyonların ortaya konulması için DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Mutasyon analizi yapılan 52 izolatın %98'inde *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır. İzolatların %57'sinde 531. kodonda, %23'ünde 516. kodonda, %17'sinde 526. kodonda mutasyon olduğu görülmüştür. *rpoB* gen bölgesinde oluşan en sık aminoasit değişikliği Ser531 Leu olarak belirlenmiştir. ÇİD suşların %86.5'inde *katG* geninde, %28.8'inde *inhA* promoter gen bölgesinde mutasyon tespit edilmiş; *katG* geninde en sık görülen aminoasit değişikliği Ser315Thr olarak izlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda incelenen suşlarda saptanan mutasyonların, dünya genelinde yaygın olan mutasyonlar olduğu görülmektedir.

Anahtar sözcükler: Tüberküloz, mutasyon

PP - 055

Vankomisine Dirençli Enterokoklarda Moleküler Epidemiyolojik Analiz

Faruk Karakeçili¹, Burcu Dalyan Cilo², Alper Karagöz³, Halis Akalın⁴, Cüneyt Özakin²

¹Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan

²Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

⁴Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

Amaç: Bu çalışmada, hastanede yatan hastalardan izole edilen vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşlarının, hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi açısından *Arbitrarily primed*-PCR (AP-PCR) ve *Pulsed-field* jel elektroforezi (PFGE) yöntemleri kullanılarak klonal ilişkilerinin tespiti amaçlanmıştır.

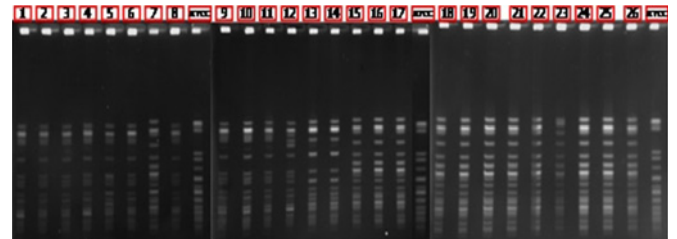
Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 2001-2009 yılları arasında izole edilen 664 VRE suşu değerlendirilmiştir. Her yıl, üçer aylık periyotlar halinde incelenmiş ve en fazla kümülasyonun olduğu muhtemel 5 ayrı epidemik döneminden 83 *E.faecium* suşu seçilerek çalışmaya

dahil edilmiştir. Glikopeptid direnci E-test yöntemi ile doğrulanmıştır. Suşlar arasındaki klonal ilişkinin tespiti için AP-PCR ve PFGE yöntemleri kullanılmıştır.

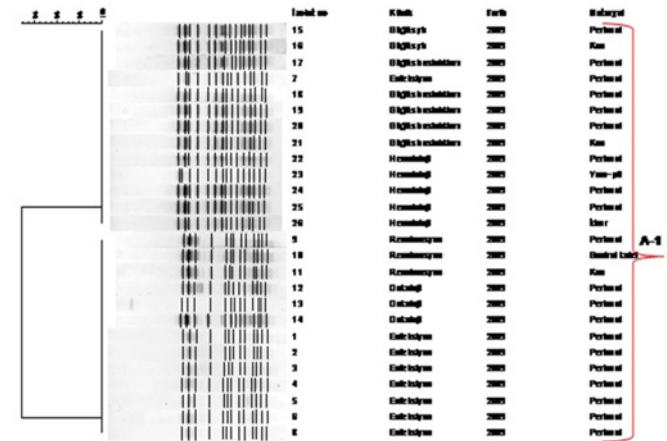
Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 83 *E.faecium* suşu, 10 farklı klinikte yatan hastalardan 63'ünün perianal sürüntü örneklerinden, 20'sinin ise farklı klinik materyallerinden izole edilmiştir. Tüm suşların AP-PCR ile 15, PFGE ile 11 farklı klonal küme içinde yer aldığı tespit edilmiştir. PFGE yöntemiyle 2001 ile 2002 yılı epidemilerinde izole edilen birçok suş arasında anlamlı benzerlik olduğu, bu klonun varlığını uzun süre koruduğu ve bu iki epidemik dönemde baskın hale geldiği saptanmıştır. Diğer üç epidemik dönemde izole edilen suşların kendi içinde benzediği, ancak farklı epidemiler arasında anlamlı bir suş benzerliği olmadığı belirlenmiştir. Özellikle 2009 yılındaki epidemide tüm suşların tek bir klonal kümede toplandığı, daha önce izole edilmeyen yeni bir suşun tüm hastaneye yayıldığı izlenmiştir (Şekil 1 ve 2).

Sonuç: VRE enfeksiyonlarının kontrolünde, bu bakteri ile kolonize olan hastaların erken tespiti ve nozokomiyal salgın ile ilişkilerinin gösterilmesi önemlidir. Nozokomiyal epidemiler sırasında izole edilen VRE suşları arasındaki klonal ilişkinin tespitinde moleküler yöntemler kullanılmalıdır. PFGE salgın süreyansında, salgın suşları arasındaki ilişkinin gösterilmesi ve salgın kaynağının tespitinde "altın standart" yöntem olarak kabul edilmektedir.

Anahtar sözcükler: Moleküler epidemiyolojik analiz, vankomisine dirençli enterokok



Şekil 1. 2009 yılındaki epidemik dönemde izole edilen 26 VRE suşunun PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



Şekil 2. 2009 yılındaki epidemik dönemde izole edilen 26 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı

PP - 056

Su Kökenli Patojenlerin Tespitinde Kullanılan Konvansiyonel veya Yeni Bakteriyolojik Kirlilik İndikatörlerinin Duyarlılığının Moleküler ve Kültivasyon Yöntemleriyle Belirlenmesi

Müjdat Özgür, Ece Şen

Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne

Amaç: Bu çalışmada, çeşitli su kaynaklarında mikrobiyal kirlilik indikatörü bakteriler ve son yıllarda yeniden önem kazanan bazı patojenlerin saptanması ve kantitasyonunda, konvansiyonel membran filtrasyon yöntemi ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR) sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Edirne İli kent merkezi ve yakınlarındaki süs havuzları, nehirler, dereler ve Ergene Nehri kıyısında bulunan bir çeltik tarlası olmak üzere toplam on istasyondan alınan su örnekleri dahil edilmiştir. Membran filtrasyonu yöntemi ile, 22°C ve 36°C'de inkübe edilen örneklerde koliformlar, *Escherichia coli*, fekal enterokoklar, sülfid indirgeyen anaerop *Clostridium*'lar ve *Aeromonas* cinsi bakterilerin izolasyonu ve toplam koloni sayımı yapılmıştır. Q-PCR yöntemiyle *E.coli*'nin beş patojenik tipi (EHEC, ETEC, EPEC, EIEC ve EAEC), *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila* ve *Leptospira interrogans* bakterilerinin varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Q-PCR yöntemiyle *L.interrogans* ve *E.coli*'nin patojenik tiplerinden EIEC incelediğimiz su örneklerinde tespit edilmemiştir. Ancak bazı numunelerde, *E.coli*'nin diğer patojenik tipleri ve ayrıca *E.faecalis*, *C.perfringens*, *L.pneumophila* patojenleri saptanmıştır. Q-PCR yöntemiyle, EPEC, dikkate değer şekilde çok tespit edilmiş; fekal enterokoklardan sadece *E.faecalis* araştırıldığından bütün istasyonlarda tespit edilmemiştir. Sülfid indirgeyen *Clostridium*'ların görülmediği sadece iki süs havuzu vardır. Q-PCR yöntemiyle *L.pneumophila* 5 adet istasyonda tespit edilmiştir. Sadece membran filtrasyon yöntemiyle çalışılan *Aeromonas* cinsi bakteriler 7 adet istasyonda saptanmıştır.

Sonuç: Q-PCR yönteminin membran filtrasyon yöntemine göre sonuç elde etme süresinin çok kısa olduğu, çok daha özgün, daha az miktarda örnekle çalışabildiği ve su örneklerini kültüre almadan da aranılan bakterinin tespit edilebildiği görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Su örnekleri, gerçek zamanlı PCR

PP - 057

Karbapenem Dirençli *Pseudomonas* spp. Suşlarında OXA-23, OXA-40, OXA-58 Genlerinin Moleküler Yöntemle Tesbiti

Fatma Esenkaya Taşbent, Mehmet Özdemir

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

Amaç: *Pseudomonas* türleri, karbapenem direncine neden olan karbapenemazlara sahiptirler. Bu çalışmada, karbapenem dirençli *Pseudomonas* spp. suşlarında, OXA tipi karbapenemaz üretimine neden olan OXA-23, OXA-40, OXA-58 gen bölgelerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Kasım 2011 - Ekim 2013 tarihleri arasında, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 184 karbapenem dirençli *Pseudomonas* spp. suşu dahil edilmiştir. Klinik izolatların tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıkları otomatize sistem ve konvansiyonel yöntemler ile yapılmıştır. Karbapenem direnci saptanan klinik örneklerde, Hyplex CarbOxa ID PCR ticari kiti (BioTrading, Hollanda) ile OXA-23, OXA-40 ve OXA-58 genlerinin varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya alınan 184 örnekte 12'sinde (%6.5) OXA-23 pozitifliği saptanırken, birer örnekte (%0.5) olmak üzere OXA-40 ve OXA-58 genleri tespit edilmiştir.

Sonuç: Karbapenem direncinde en önemli mekanizma, karbapenemaz aracılı enzimatik hidroliz mekanizmasıdır ve bu mekanizma *Acinetobacter baumannii*'de olduğu gibi *Pseudomonas*'larda da bulunur. OXA karbapenemazların bazıları zayıf karbapenemaz aktivitesi gösterebilir de, karbapenem direncinde ikincil bir mekanizma olarak direnç mekanizmasına katkıda bulunabilir. Bu çalışma ile, ilimizdeki *Pseudomonas* suşlarında OXA grubu karbapenemaz gen bölgelerinin ortaya konması, ülkemiz epidemiyolojik verilerine katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas*, OXA-karbapenemaz

PP - 058

Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde *Staphylococcus aureus* Küçük Koloni Varyantlarının Prevalansı ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Nagehan Pakaşçıoğlu¹, Gamze Kaya², Öner Kipritçi¹, Zeynep Tamay², Nermin Güler², Hasan Nazik¹¹Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul²Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Staphylococcus aureus kistik fibroz (KF) olgularında solunum yolu örneklerinden ilk izole edilen patojenlerdendir. *S.aureus* küçük koloni varyantları (KKV) ile enfeksiyon/kolonizasyon oranları da KF hastalarında giderek artmaktadır. Bu çalışmada hastanemize başvuran KF hastalarının solunum yolu örneklerinde *S.aureus* KKV prevalansının ve antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 15 Nisan 2013 – 20 Şubat 2014 tarihleri arasında 84 KF hastasından alınan toplam 305 solunum yolu örneği incelenmiştir. % 5 koyun kanlı Columbia agar ve Chapman besiyerindeki *S.aureus* KKV şüpheli kolonilerden Columbia kanlı agar ve Schaedler agara eş zamanlı ekimler yapılmıştır. KKV açısından anlamlı bulunan suşların tüpte koagülaz ve *S.aureus* lateks aglütinasyon testleri yapılmış, *S.aureus* oldukları *nucA* PCR ile doğrulanmıştır. *S.aureus* KKV suşlarının penisilin G, sefoksitin, vankomisin, klindamisin, klaritromisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılıkları E-test ile; gentamisin, levofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) ve rifampisine duyarlılıkları ise disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan 84 hastanın 60'ında (%71.4) metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA), 18'inde (%21.4) ise *S.aureus* KKV saptanmıştır. *S.aureus* KKV suşlarının %81.6'sı penisiline, %21.1'i klaritromisine, %10.5'i tetrasiklin ve klindamisine, %15.8'i levofloksasine, %7.9'u rifampisin ve gentamisine, %5.3'ü SXT'ye dirençli bulunmuştur. Vankomisin, sefoksitin ve tigesikline direnç saptanmamıştır. *S.aureus* KKV suşlarının gentamisin, SXT ve levofloksasine MSSA suşlarından daha dirençli oldukları saptanmış, levofloksasine direnç farkı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur.

Sonuç olarak, antibiyotiklere daha dirençli ve persistan enfeksiyon etkeni olabilmeleri nedeniyle, KF'lu hastalarda *S.aureus* küçük koloni varyantlarının doğru tanı ve tedavisinin önemli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kistik fibroz, *S.aureus* küçük koloni varyantları

PP - 059

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Kolonizasyonu/Enfeksiyonu Epidemiyolojisi

Pınar Zarakolu¹, Barış Boral², Özgen Köseoğlu Eser², Murat Cinel¹, Volkan Atmış¹, Yeşim Çetinkaya Şardan³, Murat Akova¹

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

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

³Özel Ankara Güven Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları, Ankara

Bu çalışmada, Haziran 2009-Aralık 2011 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde yatan hastalardan izole edilen karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKP) kolonizasyonu ve/veya enfeksiyonu etkeni izolatlarda, karbapenem direncinin fenotipik ve moleküler mekanizmalarının saptanması amaçlanmıştır.

Nötropenik hastalarda başlatılan aktif sürveyans programı sonucunda servis, yoğun bakım ünitesi veya kemik iliği transplantasyon merkezlerinde yatan hastalardan rektal sürüntü örnekleri haftalık olarak ertapenem (ERT) diski içeren triptik soy buyyona alınmıştır. MacConkey besiyerinde üreyen koloniler API20E sistemi (bioMérieux, ABD) ile tanımlanmıştır. Karbapenem direnci ERT E-test ile belirlenerek MİK değeri >0.5 µg/ml olan izolatlar KDKP olarak adlandırılmıştır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), AmpC, metallo-beta-laktamaz ve karbapenemaz üretimini saptamak için farklı fenotipik testler uygulanmıştır. *blaNDM-1*, *blaKPC*, *blaOXA-48*, *blaCTX-M*, *blaIMP* ve *blaVIM* direnç genlerini saptamak için PCR yöntemi kullanılmıştır. Tıbbi kayıtlar incelenerek kolonize ve/veya enfekte hastalar risk faktörleri açısından değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, toplam 1.349 hastadan 2.850 perirektal sürüntü örneği alınmıştır. Hastaların 126'sında (%9.3) KDKP ile kolonizasyon, 4'ünde (%0.3) klinik olarak kanıtlanmış enfeksiyon saptanmıştır. Kolonizasyon saptanan 126 hastanın %48'inde immün süpresyon, %40'ında son altı ay içinde hastaneye yatış öyküsü olduğu belirlenmiştir. Hastanede yatış süresi ortalama 66 gün olup tüm hastalarda invazif girişim mevcuttur. KDKP ile kolonize tüm hastaların antibiyotik tedavisi aldığı, %31'inde ölüm gerçekleştiği gözlenmiştir. KDKP izolatlarında, fenotipik olarak herhangi bir beta-laktamaz enzimi üretimi 72 (%57) izolatta saptanmıştır. Fenotipik olarak; 72 izolatın 56'sında GSBL, 30'unda FOX/Boronik asit (BA), 18'inde IMP/EDTA ve 13'ünde ERT/BA ile pozitiflik saptanmıştır. Yetmiş iki izolatın 59'unda *OXA-48*, 51'inde *CTX-M*, 34'ünde *VIM*, 1'inde *IMP* geni pozitif olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, KDKP kolonizasyonunun ve/veya enfeksiyonunun prevalansının merkezimizde yüksek olmadığı gözlenmiştir. Direnç mekanizmaları içinde, en sık mekanizma *blaOXA-48*, ikinci mekanizma *blaCTX-M* olarak belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Karbapenem direnci, *Klebsiella pneumoniae*

PP - 060

Türkiye'deki İlk Hem NDM-1 Hem de OXA-48 Karbapenemaz Üreten Klinik *Klebsiella pneumoniae* İzolatı

Abdullah Kılıç, Mehmet Baysallar

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Enterobacteriaceae ailesi içinde, özellikle karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşları son yıllarda dünyanın birçok bölgesinde sıklıkla izole edilmektedir. Çalışmamızın amacı, hastanemizde izole edilen en az bir karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi bakterilerde bulunabilen KPC, NDM-1 ve OXA-48 karbapenemazların gerçek zamanlı PCR yöntemi ile tespit edilmesidir.

Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerden Haziran 2010 - Mayıs 2013 tarihleri arasında izole edilmiş 887 *Enterobacteriaceae* izolatından en az bir karbapeneme (ertapenem, imipenem ve meropenem) di-

rençli 49 (%5.52) suş alınmıştır. Tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri Phoenix TM 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda 49 izolatın 48'inin OXA-48, birinin ise hem OXA-48 hem de NDM-1 pozitif olduğu görülmüştür. İzolat hem sekans analizi ile hem de Fransa'daki "INSERM Research Unit" merkezine gönderilerek doğrulanmıştır. Hem OXA-48 hem de NDM-1 pozitif olan bu izolatın, Şanlıurfa'dan hastanemize şiddetli solunum yetmezliği şikayetleri ile sevk edilmiş ve üç gün içinde ölen bir hastanın idrar kültüründen izole edildiği belirlenmiştir. Suriye'deki iç savaştan kaçarak Türkiye'ye göç eden yaklaşık 600.000 kişinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca yaralıları Türkiye'nin sınır illerindeki hastanelerinde tedavi edilmektedir. Suriye'de olgu olarak bildirilen NDM-1 taşıyan izolatların, sınır bölgelerindeki illerde de yayılabileceği göz önüne alınarak gerekli tedbirlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Klebsiella pneumoniae*, karbapenemaz

PP - 061

Bacteroides fragilis Grubu Bakterilerde Antibiyotik Direncinin ve Enterotoksin Yapımının Araştırılması

Achille Aime Kangaba¹, Filiz Yarımcam Sağlam², Hrisi Bahar Tokman¹, Müzeyyen Mamal Torun²

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Bacteroides fragilis grubu (BFG) bakteriler ciddi intra-abdominal, yara, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olan önemli patojenlerdir. Bazı suşlar fragilizin adı verilen enterotoksin üretmekte ve buna bağlı olarak hem çocuklarda, hem yetişkinlerde ishale neden olmaktadır. Son yıllarda bu bakterilerin antibiyotiklere olan direncinde artış olduğu bildirilmektedir. Polimikrobiyal enfeksiyon şüphesiyle gelen klinik örneklerde anaerob bakteriler rutin olarak araştırılmakta, ancak antibiyotik duyarlılıklarına, zor, pahalı ve zaman alıcı olduğu için bakılmamaktadır. Anaerob bakterilerde antibiyotik duyarlılık testlerinin yerel direnç profilini ortaya koyup empirik tedavinin belirlenmesi için belirli aralıklarla standart yöntemlerle yapılması önerilmektedir.

Bu çalışmada, klinik örneklerden ve gaitadan izole edilen 50 BFG bakteride antibiyotik direnci E-test, β-laktamaz üretimi nitrosefin diski, direnç genleri ve enterotoksin geni multipleks PCR ile araştırılmıştır. Kökenlerin 41'nde ampisilin, 33'ünde klindamisin, 32'sinde tetrasiklin, 16'sında sefoksitin, 7'sinde amoksisilin/klavulanik asit, 2'sinde imipenem ve 2'sinde metronidazol direnci, 41 kökünde β-laktamaz üretimi saptanmıştır. Klinik ve gaita örnekleri arasında antibiyotik direnci açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Antibiyotiklere direnç genleri *erm*, *cfiA*, *nim*, *tetQ* ve *cepA* sırasıyla 34, 6, 3, 35 ve 3 kökünde pozitif bulunmuştur. Fenotipik direnç ile direnç geni varlığı arasında uyum tespit edilememiştir. Enterotoksin *bft* geni 10 kökünde (4 klinik, 6 gaita) saptanmıştır.

BFG bakterilerde gözlenen antibiyotik direncinin tek gen ürünüyle değil, daha kompleks mekanizmalarla oluştuğu görülmektedir. İntestinal mikrobiyotayı oluşturan bakterilerin oral olarak alınan tüm antibiyotiklerle karşılaştıkları düşünülerek, bakteriler arası gen aktarımının daha ayrıntılı incelenmesinin antibiyotik direncinin kontrolü için yeni yöntemler bulunmasına imkan sağlayabileceği öngörülebilir.

Anahtar sözcükler: *Bacteroides fragilis*, fragilizin

PP - 062 NUMARALI BİLDİRİ İPTAL EDİLMİŞTİR.

PP - 063

2002–2012 Yılları Arasında Kan Örneklerinden İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Özellikleri

Alper Tekeli¹, Duygu Öcal¹, Büşra Betül Özmen¹, Zeynep Ceren Karahan², İştah Dolapçı¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada, 2002–2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni-Sina Hastanesinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının moleküler özelliklerinin belirlenerek, tiplendirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: VITEK 2 Compact (bioMerieux, Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ile MRSA olarak tanımlanan 134 suşun *mecA*, Panton Valentine lökositidin (PVL), *sasX*, *Arginine Catabolic Mobile Element* (ACME), *icaA*, *icaD* ve IS256 genleri standart polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); SCC*mec*, agr tipleri ve toksin genlerinin varlığı ise multiplex PCR ile çalışılmış, klonal ilişkileri *pulsed-field* jel elektroforezi (PFGE) ve *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) ile araştırılmıştır. Biyofilm özelliklerinin fenotipik olarak değerlendirilmesinde Kongo kırmızılı agar (KKA) besiyeri kullanılmıştır.

Bulgular: Suşların tümü PCR ile *mecA* pozitif olarak bulunmuştur. Hiçbirisinde PVL, *sasX* ve ACME gen varlığına rastlanmamıştır. SCC*mec* tipleri açısından incelendiğinde 125'i (%93.3) tip III olarak saptanmıştır. Toksin genlerinden en sık stafilokokkal enterotoksin A (n:130, %97) görülmüştür. agr tipleri incelendiğinde %89.5 (120/134) agr tip I saptanmıştır. İzolatların hepsinin araştırılan biyofilm genlerini (*icaA*, *icaD*, IS256) taşıdığı ve KKA'da biyofilm oluşumunu gösteren siyah koloni yaptığı görülmüştür. PFGE sonuçlarına göre, suşların 9 patern oluşturduğu; iki büyük grupta toplandığı [grup A: %51 (n:69); grup B: %39,5 (n:53)] ve bu 2 grubu temsil eden izolatların sekans tiplerinin ST239 olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bu çalışmada, hastanemizde 10 yıl içerisinde kan kültürlerinden izole edilen ve randomize olarak seçilen MRSA suşlarının genotipik özellikleri ortaya konulmuştur. MRSA suşlarının özelliklerinin ortaya konulması ve olası değişimlerin izlenebilmesi için geniş çaplı ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, kan izolatu

üremeler sadece bir kez değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 128 *P.aeruginosa* suşununun 70'inin (%55) mukoid, 58'inin (%45) non-mukoid fenotipte olduğu saptanmıştır. Mukoid suşların, %4.3'ü piperasiline, %2.9'u piperasilin-tazobaktama, %18.5'i aztreonama, %7.2'si seftazidime, %4.3'ü sefepime, %27.1'i imipeneme, %29'u meropeneme, %21.4'ü gentamisine, %1.9'u tobramisine, %8.7'si netilmisine, %23'ü amikasin, %15'i siprofloksasine ve %33.8'i levofloksasine dirençli bulunmuştur. Non-mukoid suşlarda direnç oranları ise; piperasilin için %3.4, piperasilin-tazobaktam için %3.6, aztreonam için %16.4, seftazidim için %5.2, sefepim için %5.2, imipenem için %17.5, meropenem için %10.3, gentamisin için %36.2, tobramisin için %27.6, netilmisin için %24.1, amikasin için %34.5, levofloksasin için %14.3 ve siprofloksasin için %5.8 olarak tespit edilmiştir. Suşların hiçbirinde kolistine direnç saptanmamıştır. Mukoid *P.aeruginosa* suşlarının meropenem ve levofloksasine, non-mukoid *P.aeruginosa* suşlarının ise tobramisin ve netilmisine daha dirençli olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

Sonuç olarak, KF'lu hastalarda *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının mortaliteyi artırmaları nedeniyle, doğru tanı ve uygun tedavinin önemi bir kez daha vurgulanmıştır.

Anahtar sözcükler: Kistik fibroz, *Pseudomonas aeruginosa*

PP - 065

Kistik Fibroz Dışı Kronik Akciğer Hastalığı Tanısı Olan Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde *Staphylococcus aureus* Küçük Koloni Varyantlarının ve Metisiline Dirençli *S.aureus* Suşlarının Araştırılması

Nagehan Pakaçtıçalı¹, Gamze Kaya², Öner Kipritçi¹, Zeynep Tamay², Nermin Güler², Hasan Nazik¹

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

²İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Bu çalışmada kronik akciğer hastalığı (KAH) tanılı olguların solunum yolu örneklerinde metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve *S.aureus* küçük koloni varyantlarının (KKV) prevalansları ve antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Çalışmada, 15 Nisan 2013–20 Şubat 2014 arasında 55 hastanın 77 solunum yolu örneği değerlendirilmiştir. Örnekler %5 koyun kanlı Columbia, Chapman ve CHROMagar MRSA besiyerlerine ekilmiş, *S.aureus* KKV şüpheli kolonilerden Columbia ve Schaedler agara eş zamanlı ekim yapılmıştır. Anlamli bulunan suşların tüpte koagülaz ve *S.aureus* lateks aglütinasyon testleri yapılmış, tanımlamaları *nucA* PCR ile doğrulanmıştır. CHROMagar MRSA besiyerindeki leylak renkli koloniler için DNaz ve MRSA lateks aglütinasyon testleri uygulanmıştır. Metisilin direnci sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış, *femB* (tanımlama)-*mecA-mecC* multiplex PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. *S.aureus* KKV suşlarının penisilin G, sefoksitin, vankomisin, klindamisin, klaritromisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılıkları E-test ile, gentamisin, levofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) ve rifampisine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) ve MRSA izolatlarının penisilin G, gentamisin, levofloksasin, SXT, vankomisin, teikoplanin, eritromisin, klindamisin, telitromisin, linezolid ve tetrasikline duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile saptanmıştır.

Çalışmamızda, 55 KAH hastasının 24'ünden (%44) MSSA, 3'ünden (%5.5) MRSA ve 3'ünden (%5.5) *S. aureus* KKV izole edilmiştir. MRSA suşlarının tamamı *mecA* pozitif, *mecC* negatif olarak saptanmıştır. MSSA izolatlarının tümü (n: 29; %100) penisiline, %17'si eritromisine, %14'ü klindamisine dirençli bulunmuştur. *S.aureus* KKV suşlarının tümünün penisiline, 1'inin ek olarak klaritromisine de dirençli olduğu belirlenmiştir. MRSA suşlarının 1'i penisilin, eritromisin ve klindamisine, diğer ikisi sadece penisiline dirençli bulunmuştur. Sonuç olarak, *S.aureus* KKV ve MRSA'nın doğru tanı ve tedavisinin büyük önem taşıdığına bir kez daha vurgulanması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kronik akciğer hastalığı, *Staphylococcus aureus*

PP - 064

Bir Yıllık Süre İçinde Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde *Pseudomonas aeruginosa* Prevalansı ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Nagehan Pakaçtıçalı¹, Öner Kipritçi¹, Gamze Kaya², Kamber Kaşalı³, Zeynep Tamay², Nermin Güler², Hasan Nazik¹

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

²İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

³İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı, İstanbul

Bu çalışmada, hastanemize başvuran kistik fibroz (KF) hastalarının solunum yolu örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* prevalansı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 2013 yılında 103 KF hastasından alınan 371 solunum yolu örneği incelenmiştir. Üreyen koloniler, Gram boyanma, oksidaz pozitifliği, pigment oluşumu, 42°C'de üreme gibi konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmıştır. *P.aeruginosa* izolatlarının piperasilin, seftazidim, gentamisin, levofloksasin, aztreonam, amikasin, piperasilin-tazobaktam, siprofloksasin, kolistin, sefepim, imipenem, meropenem, netilmisin, tobramisin, sefoperazon-sulbaktam duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan 371 örneğin 132'sinden (%35.6) 210 *P.aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Bir hastaya ait aynı direnç paternine sahip

PP - 066

Akut Gastroenteritli Çocuklarda *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC) Serotipinin Kromojenik Besiyeri ve *In-house* PCR İle Tespiti

Emine Tunç¹, Aslı Giray Kurt², Derya Bozkurt³, Doruk Engin⁴, Ayşe Selimoğlu³, Barış Otlı¹

¹Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

²Inönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü, Malatya

³Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Malatya

⁴Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) O157:H7 serotipi tehlikeli gıda kaynaklı patojenlerin başında gelmektedir. Tespit edilmesindeki zorluklar nedeniyle, ülkemizdeki oranlarla ilgili veri azdır. Bu çalışmanın amacı, akut ishal ile hastanemiz çocuk acil birimi ve çocuk polikliniklerine başvuran 1–161 ay grubu çocuklarda, PCR ile direkt numuneden ve kromojenik besiyerindeki şüpheli kolonilerden EHEC O157:H7 serotipi sıklığının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 01.01.2012-01.01.2013 tarihleri arasında, akut ishal sebebiyle başvuran hastalardan alınan 240 dışkı örneği dahil edilmiştir. Bu çalışmada; PCR ile *E.coli* O157:H7'nin tespiti için rfbE O antijen transporter geni ve fliC flagella antijen genlerini özgül olarak çoğaltacak birer çift primer dizayn edilmiştir. Direkt dışkı örneklerinden ve kromojenik besiyerinde (chromID O157:H7 agar, bioMerieux, Fransa) 24 saat inkübasyondan sonra üreyen şüpheli yeşil/mavi-yeşil kolonilerden *E.coli* O157:H7 tespiti için *in-house* PCR yapılmıştır. Dışkı numunelerinden QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile kültürdeki şüpheli kolonilerden ise QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak *E.coli* ATCC 35150 suşu kullanılmıştır.

Bulgular: Kromojenik besiyerinde toplam 240 dışkı kültürünün 7'sinde şüpheli renkte koloni tespit edilmiştir. Bu kolonilerden yapılan *in-house* PCR ile örneklerin 4'ünde (%1.6) *E.coli* O157:H7 DNA'sı pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin tamamı, direkt dışkıdan çalışılan PCR ile de pozitif olarak saptanmıştır. Şüpheli koloni içermeyen hiçbir örneğin direkt dışkı numunesi pozitif değildir.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarına göre, bölgemizde akut gastroenteritli hastalarda *E.coli* O157:H7 serotipi görülmektedir. Bu etkenin tespitinde kromojenik agar ile ön tarama yapılıp, doğrulama için PCR yönteminin kullanılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: *E. coli* (EHEC) O157:H7, akut ishal

kanlı ve EMB agar besiyerlerine pasajlanmıştır. Üreyen koloniler konvansiyonel yöntemlerle (Gram boyama, biyokimyasal testler) ve otomatize sistemlerle [Vitek 2 Compact ve Vitek MS (BioMérieux, Fransa)] tanımlanmıştır. Aynı olguda birden fazla örnekten tek tip mikroorganizmanın tanımlanmış olması, temel raporlama kriteri olarak alınmıştır. İncelenen 122 olgunun 61'inde (%50) üreme saptanmış olup, bunların 50'sinde tek bir mikroorganizma, 11'inde birden fazla mikroorganizma saptanmıştır. Üreyen 73 mikroorganizma ve bunların dağılımı sırasıyla; 18 (%25) gram-pozitif bakteri, 52 (%71) gram-negatif bakteri ve üç (%4) maya morfolojisinde mantar şeklindedir. Bu üç maya morfolojisinde mantar tanımlandığında tümünün *Candida albicans* olduğu görülmüştür. Mikrobiyolojik değerlendirme istenen otopsi olgularında üreyen bakterilerin dağılımı tabloda görülmektedir.

Sonuç olarak; şüpheli ölüm ve hastane enfeksiyonu sonucu ölüm şüpheli olgularda mikrobiyolojik incelemeler tanıya yardımcı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Postmortem mikrobiyoloji

Tablo. Mikrobiyolojik değerlendirme istenen otopsi olgularında üreyen bakterilerin dağılımı

Gram Negatif Bakteriler	n	Gram Pozitif Bakteriler	n
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	Koagülaz negatif Stafilokok	5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	9	<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	<i>Micrococcus luteus</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	<i>Viridans streptokok</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1	<i>Kocuria cristinae</i>	1
Toplam	52	Toplam	18

PP - 068

H.pylori Patogenezinde Rol Oynayan 9 Virülans Faktörünün Çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Tanımlanması, Virülans Faktörleri İle Patojenite Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Sinem Öktem Okullu¹, Murat Saruç³, Arzu Tiftikçi³, Bahattin Çiçek³, Eser Vardareli³, Aysun Bozbaş⁴, Nurdan Tözün³, Tanıl Kocagöz², Ayça Sayı Yazgan¹

¹İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

²Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

⁴Acıbadem Hastaneler Grubu, Gastroenteroloji Bölümü, İstanbul

Helicobacter pylori ile enfekte hastaların sadece bir kısmında, klinik belirtilerle birlikte gastrik patolojinin gelişmesi, bakterinin virülans özelliklerine bağlanmıştır. *H.pylori*'nin patogenezinde başlıca virülans faktörlerini kodlayan 9 temel gen; *cagA*, *vacA*, *babA*, *oipA*, *hpaA*, *ureA*, *ureB*, *dupA* ve *napA*'dır. Bu çalışmanın amacı, *H.pylori*'nin virülans faktörlerini belirleyebilmek için çoklu bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) geliştirilmesi ve *H.pylori* ile enfekte olan gastrit ve ülserli hastalarda patolojik belirtiler ile *H.pylori* virülans faktörlerinin arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Çalışmaya ilk defa tanı konmuş 80 gastrit veya ülserli hasta dahil edilmiştir. Endoskopi sırasında midenin antrum ve korpus bölümlerinden alınan iki ayrı mukozal biyopsi örneğinden DNA saflaştırıldı.

PP - 067

Otopsi Olgularında Postmortem Olarak Saptanan Mikroorganizmaların Dağılımı

Aslı Çakar, Asiye Bıçakçığıl, Hacer Aslan, Aydan Karagül, Cumhur Özkuyumcu

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Postmortem mikrobiyoloji; adli şüphesi olan ölüm olgularında, ani bebek ölümü sendromunda, kuşku besin zehirlenmeleri, nozokomiyal mikroorganizmaların araştırılması, antemortem tanının doğrulanması, tedavinin değerlendirilmesi ve organ transplantasyonu sürecinde kullanılmaktadır. Postmortem mikrobiyal kültürler gerçek pozitiflikten, agonal yayılmadan, kontaminasyon ve postmortem translokasyondan kaynaklanabilir.

Bu çalışma ile 1 Ocak 2010 - 31 Aralık 2013 tarihleri arasında Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığında yapılan otopsilerin 122'sinden enfeksiyon kaynaklı ölüm şüphesi nedeniyle mikrobiyolojik tetkik istenmiş ve bu olgulardan alınan örnekler mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmiştir. Mikrobiyolojik değerlendirme istenen olgulardan, olgunun öyküsüne göre en az üç örnek olmak üzere başta kalp kanı ve yanı sıra akciğer, dalak, karaciğer ve BOS örnekleri alınmıştır. Örnekler; 50 ml'lik beyin-kalp infüzyon buyyon içerisinde 18-24 saat 37°C de etüvde inkübe edilmiş ve %5 koyun

rilmiştir. Çalışmalar sonucunda 9 farklı virülans geni, herbirinde birkaç tanesi saptanabilen 4 farklı çoklu PCR ile incelenebilir hale gelmiş; *vacAs1/s2* ve *m1/m2* ancak tekli PCR ile incelenebilmiştir. Ülserli ve gastritli hastalardan izole edilen *H.pylori* suşlarının *hpaA* (ülser için %82, gastrit için %75), *vacA s1* ve *m2* (ülser için %52, gastrit için %50 ve %73) virülans faktörlerinin yüksek oranda pozitif, *oipA* ve *babA* virülans faktörleri için negatif olduğu saptanmıştır. Gastritli hastalarda *cagA* pozitifliğinin (%61) ülserli hastalardan (%56) biraz daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Ülserli grupta *dupA* pozitifliğine rastlanmazken, gastritli grupta *dupA* pozitifliği %9 olarak saptanmıştır. Gastritli ve ülserli grup karşılaştırıldığında *napA* pozitifliğinin ülserli grupta daha fazla (ülser için %43, gastrit için %22) olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, *H.pylori*'ye ait 9 virülans faktörü dört farklı PCR ile saptanabilmiştir. Gastrit ve ülserli hastalarda kolonizasyona neden olan *H.pylori* suşlarının büyük oranda *hpaA*, *vac s1/m2* pozitif olduğu, *oipA*, *babA* negatif olduğu gösterilmiştir. *H.pylori* ile enfekte olan *cagA*, *vacAs1m2* ve *hpaA* pozitif olan hastalarda intestinal me- taplazi varlığı gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, virülans faktörleri

PP - 069

Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Genlerinin Araştırılması

Tuba Dal¹, Nida Özcan², İdris Kandemir², Neslihan Genişel², Alicem Tekin², Mehmet Sinan Dal³, Tuncer Özekinci²

¹Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

³Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Diyarbakır

Amaç: Metallo-beta-laktamaz (MBL)'lar, monobaktamlar hariç bütün beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumludurlar. Bilinen MBL'lar arasında *blaIMP*, *blaVIM* ve son yıllarda önem kazanan *blaNDM*, *Acinetobacter baumannii*'nin bakteriyel direncinde önemli mekanizmalar olarak bildirilmiştir. MBL enzimini kodlayan genler sınıf 1 integronlar içindeki gen kasetlerinde bulunmaktadır. Gen kasetleri bölgeye özgü rekombinasyon sistemiyle farklı integronlara taşınarak direnç genlerinin bakteriler arası yayılımına neden olmaktadır. Bu çalışmada, hastanemizdeki *A.baumannii* izolatlarında MBL genlerinin varlığının araştırması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Dicle Üniversitesi Hastanelerinin yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastaların, Ekim 2012- Şubat 2013 tarihleri arasında gönderilen klinik örneklerinden izole edilen, BD PhoenixTM 100 (Becton Dickinson, ABD) mikrobiyoloji sistemi ile *A.baumannii* olarak tanımlanan ve geleneksel yöntemlerle *A.baumannii* olduğu doğrulanmış karbapeneme dirençli 80 izolat çalışılmıştır. İzolatların MBL üretimi Modifiye Hodge testi (MHT) ile taranmıştır. Multipleks PCR yöntemi ile *blaVIM*, *blaIMP*, *blaNDM* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Moleküler yöntem olarak Hyplex® CarbOxa ID (Amplex, Almanya) test sistemi kullanılmıştır. İlgili gen kümelerinin PCR ile amplifikasyonu ve elde edilen amplifikasyon ürünlerinin ELISA temelli bir sitemde özgül oligonükleotid prolarla hibridizasyonunu sağlanmıştır.

Bulgular: Seksen izolatın, 46 (%57.5)'sı erkek, 34 (%42.5)'ü kadın hastalara aittir. İzolatların 32'si trakeal aspirat, 21'i kan, 11'i yara, 10'u kateter, 5'i idrar, 1'i ise dren örneğinden soyutlanmıştır. On bir izolatta (%13.75) MHT pozitifliği saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde *blaNDM* saptanamazken, 13 (%16.25) izolatta *blaIMP*, 3 (%3.75) izolatta *blaVIM* varlığı tespit edilmiştir. Bir izolatın (%1.25) *blaIMP* ve *blaVIM* genlerini bir arada taşıdığı gözlemlenmiştir. MBL saptanan tüm izolatlarda MHT pozitifdir. İzolatların yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı tabloda gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızın verileri, hastanemizde izole edilen karbapeneme dirençli *A.baumannii* suşlarında MBL varlığının %13.75 oranında olduğunu ve en sık (%16.25) *blaIMP* direnç genine rastlandığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, metallo-beta-laktamaz

Tablo. MBL genlerinin yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı; n (%)

	Göğüs Tüberküloz	Genel Cerrahi	Kardiyoloji	Nöroloji	Pediyatri	Dahiliye	Anestezi
<i>blaIMP</i>	3 (3.75)	3 (3.75)	2 (2.50)	2 (2.50)	2 (2.50)	1 (1.25)	-
<i>blaVIM</i>	2 (2.50)	-	-	-	-	-	1 (1.25)
<i>blaIMP+</i> <i>blaVIM</i>	1 (1.25)	-	-	-	-	-	-

PP - 070

Siğir Safralarından İzole Edilen *Campylobacter* spp. Suşlarının Genotiplendirilmesi ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Seçil Abay¹, Hamit Kaan Müştak², Fuat Aydın¹

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada, siğir safra örneklerinde *Campylobacter* türlerinin prevalansının saptanması, elde edilen izolatların genotiplerinin değerlendirilmesi ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Şubat 2013-Nisan 2013 tarihleri arasında Kayseri ilinde mezbahalarda kesilen siğirlara ait 115 adet safra örneği dahil edilmiştir. Fenotipik yöntemler ile *Campylobacter* spp. olarak tanımlanan izolatların tür düzeyinde tanımlanması multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (M-PCR) ile gerçekleştirilirken, genotipleri *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR) ile belirlenmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle saptanmıştır.

Bulgular: İncelenen 115 siğir safra örneğinin 67'si (%58.26) *Campylobacter* spp. yönünden pozitif bulunmuş ve toplam 89 *Campylobacter* izolatı elde edilmiştir. İzolatların 59'u (%66.29) *C.jejuni*, 28'i (%31.46) *C.fetus subsp. fetus* ve 2'si (%2.24) de *C.coli* olarak tanımlanmıştır. On safra örneğinde *C.jejuni* ve *C.fetus*; bir safra örneğinde ise *C.jejuni* ve *C. oli* eş zamanlı olarak izole edilmiştir. İzolatların trimetoprim-sülfametoksazol, nalidiksik asit, ampisilin, siprofloksasin, enrofloksasin ve tetrasikline direnç oranları sırasıyla, %92.13, %43.82, %11.23, %6.74, %2.24 ve %1.12 olarak belirlenmiştir. İzolatların tamamı eritromisine duyarlı olarak saptanmıştır. Genotiplendirilmede, *C.jejuni* izolatlarında 1 ile 7 suş içeren 33, *C.fetus* izolatlarında ise 1 ile 8 suş içeren 10 ERIC profili elde edilirken, 2 adet *C.coli* izolatının aynı genotipte olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç: Siğir safralarından izole edilen *Campylobacter* spp. suşlarının çeşitli antibakteriyellere duyarlı olmakla birlikte, çok sayıda farklı genotiplere sahip olmaları; safraların, kesimhanede karkas kontaminasyonu için önemli bir kaynak olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *Campylobacter* spp., ERIC-PCR

PP - 071

Ampisiline Dirençli Klinik *Salmonella enterica* İzolatlarında β -laktamaz Genlerinin ve Klonal İlişkinin Araştırılması

Yamaç Tekintaş¹, Ferda Fethiye Yılmaz¹, Şöhret Sabire Aydemir², Alper Tünger², Mine Hoşgör Limoncu¹

¹Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

İnsanlarda ve hayvanlarda enfeksiyona yol açan 2600'den fazla serotipi bulunan *Salmonella* türleri dünyada en sık karşılaşılan enterit etkenlerinden biridir. *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde β -laktam antibiyotiklerin sıklıkla kullanılması, bu antibiyotiklere dirençli ve genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten suşların ortaya çıkması açısından risk oluşturmaktadır. *Salmonella* türlerinde TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, PSE ve CMY tipi GSBL enzimleri yaygın olarak saptanmaktadır. Bu çalışmada, *Salmonella* kökenlerinde ampisilin direncinin araştırılması, ampisiline dirençli kökenlerde GSBL enzimlerinin varlığının ve klonal grupların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ege Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji Laboratuvarında 2010-2012 yıllarında izole edilen 117 *S. enterica* kökeni arasında ampisiline dirençli kökenler Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle seçilmiştir. Bu kökenlerde ampisilin MİK değerleri CLSI kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kökenlerin klonal yakınlığı ERIC-PCR ve AP-PCR yöntemleriyle araştırılmıştır. GSBL üretimi fenotipik olarak kombine disk difüzyon yöntemiyle saptanmıştır. Ayrıca PCR ile *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*PER, *bla*SHV genlerinin varlığı araştırılmıştır.

Disk difüzyon yöntemi ile, 10 (%8.5) *S. enterica* kökeninin ampisiline dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu kökenlerin ampisilin MİK aralığı 128 μ g/ml \geq 512 μ g/ml olarak bulunmuştur. Kökenler ERIC-PCR'a göre 6 farklı, AP-PCR'a göre 5 farklı klonal grupta toplanmıştır. Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL pozitif iki köken tespit edilmiştir. İki kökende *bla*CTX-M, beş kökende *bla*TEM saptanmıştır. Hiçbir kökende *bla*PER ve *bla*SHV genlerine rastlanmamıştır.

Çalışmamız, iki yıllık dönemde *S. enterica* kökenlerinde ampisilin direncinin yaygın olmadığını, GSBL genlerinin farklı epidemiyolojik kümelerle ait kökenlerde bulunduğunu, GSBL genlerinin literatürde belirtildiği gibi yaygın olarak bulunmadığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Salmonella enterica*, β laktam direnci

PP - 072

Yoğun Bakım Hastalarından İzole Edilen Vankomisine Dirençli *Enterococcus* spp. İzolatlarının Moleküler tanısı, Direnç ve Virülans Genlerinin Araştırılması

Tuba Kayman¹, Seçil Abay², Bülent Bozdoğan³, Harun Hızlısoy², Fuat Aydın², Ahmet Gödekmerdan⁴, Barış Otlu⁵

¹Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul
²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri
³Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın
⁴Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
⁵İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Bu çalışmada, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, yoğun bakım hastalarından gönderilen klinik örneklerden (22 perianal sürüntü, 9 kan, 8 idrar, 1 yara) izole edilen toplam 40 adet vankomisine dirençli enterokok (VRE) izolatının tür düzeyinde tanımlanması, vankomisin direnci ve virülans genlerinin moleküler olarak araştırılması amaçlanmıştır. İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları konvansiyonel yöntemler ve VITEK 2 otomatize sistemiyle yapılmıştır. İzolatların cind ve tür düzeyinde tanımlanmaları ve *vanA*, *vanB* ve *vanC* direnç genlerinin araştırılması multipleks PCR (mPCR) ile gerçekleştirilmiştir. Tür düzeyinde tanımlamada, *E. faecalis* ve *E. faecium*'a özgül primerler kullanılmıştır. İzolatlardaki *aggregation substance* (*asa*), *collagen-binding protein* (*ace*),

cytolysin (*cyl*), *Enterococcus faecalis endocarditis antigen* (*efa*), *enterococcal surface protein* (*esp*), jelatinaz (*gel*) ve hiyaluronidaz (*hyl*) virülans genlerinin varlığı yine multipleks PCR ile araştırılmıştır.

İncelenen toplam 40 VRE ön tanımlı izolatın 35'i *E. faecium*, 4'ü *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca mPCR'da cins pozitif ancak tür düzeyinde tanımlanamayan bir izolat sekans analizi ile *E. casseliflavus* olarak tanımlanmıştır. İzolatların 27'sinin *vanA*, birinin *vanB* ve birinin de *vanC* direnç genine sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatların sahip olduğu virülans genlerinin dağılımı tabloda gösterilmiştir.

Sonuç olarak, klinik yönden önem taşıyan VRE izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması ve antibakteriyel direnç durumlarının kesin ve doğru olarak belirlenmesinde moleküler yöntemlerin kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Enterococcus* spp., vankomisine dirençli enterokok

Tablo. *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarında virülans genlerinin dağılımı

İzolat (toplam sayı)	Pozitif suş sayısı*						
	<i>ace</i>	<i>asa</i>	<i>cyl</i>	<i>efa</i>	<i>esp</i>	<i>gel</i>	<i>hyl</i>
<i>E. faecium</i> (35)	2	2	1	3	30	29	6
<i>E. faecalis</i> (4)	4	3	1	4	4	3	0

* Suşlarda birden fazla gen pozitifliği mevcuttur.

PP - 073

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Bacteroides* Türlerinin Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç Durumunun Belirlenmesi ve Dirençten Sorumlu Genlerin Araştırılması

Nurver Ülger Toprak¹, Öncü Akgül¹, Pınar Günay², Arda Kekilli², Güner Söyletir¹

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrencisi, İstanbul

Normal barsak mikrobiyotasında bulunan *Bacteroides* türleri, ba-
tın içi apsesi, bakteriyemi gibi yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara
yol açabilirler. Bu bakteriler, anaerop enfeksiyonlardan en sık izo-
le edilen ve antibiyotiklere en fazla direnç gösteren patojenlerdir.
Beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç, çoğunlukla β -laktamaz
enzimleriyle gerçekleşir. En yaygın görülen β -laktamaz, bakteri
kromozomunda bulunan *cepA* geni tarafından kodlanan, 2e sını-
fından bir sefalosporinaz enzimidir; penisilin ve sefalosporinlere
direnci sağlar. Ancak, sulbaktam, klavulonat ve tazobaktam ile
inhibe olur. Diğer bir β -laktamaz, *cfxA* geni tarafından kodlanan
ve sefoksitin direncinden sorumlu olan bir enzimdir. Karbapen-
emlere direnç ise *cfiA* geni tarafından kodlanan metallo- β -lak-
tamaz enzimi ile gerçekleşir; genin ekspresyonu önünde bulunan
IS elementleriyle sağlanır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden
izole edilen *Bacteroides* türlerinde, β -laktam grubu antibiyotiklere
direncin ve β -laktamaz enzimlerini kodlayan genlerin araştırılması
hedeflenmiştir.

Çalışmada, toplam 110 *Bacteroides* spp. izolatının tür ayrımları
yapılmış; CLSI'nın (M11-A7) önerdiği agar dilüsyon yöntemiyle
ampisilin, sulbaktam/ampisilin, amoksisilin/klavulonat, piperasi-
lin/tazobaktam, sefoksitin, meropenem ve imipenem duyarlılıkları
belirlenmiş; *cepA*, *cfxA* ve *cfiA* genleri ve IS elementleri
PCR yöntemiyle araştırılmıştır. İzolatların %95.5'i ampisiline, %9'u
sefoksitin ve β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına,
%5'i ise karbapenemlere dirençli bulunmuştur. *Bacteroides fragilis*
izolatlarının 19'unda *cfiA* geni saptanmış, genin promotor bölge-
sinde IS 1187 bulunanlar karbapenemlere ve diğer antibiyotiklere
dirençli bulunmuştur. İki izolatta herhangi bir direnç geni saptan-
mazken sefoksitine direnç görülmüştür. Bu durum β -laktamaz

aktivitesi dışında başka bir mekanizmanın rol aldığını düşündürmektedir. Sonraki hedefimiz, β -laktamlara dirençte rol alabilecek penisilin bağlayan proteinlerin analizi veya atım pompaları varlığının araştırılmasıdır.

Anahtar sözcükler: Antibiyotik direnci, *Bacteroides*

PP - 074

Salmonella ve Shigella İzolatlarında qnr Geni Varlığının Belirlenmesi

Keremtin Yanık¹, Yeliz Tanrıverdi², Adil Karadağ¹, Kemal Bilgin³, Cafer Eroğlu¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

²Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

³Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Samsun

Giriş: *Salmonella* ve *Shigella* türleri, insanlarda sıklıkla besin kaynaklı gastroenteritlere neden olmakta ve genellikle tedavilerinde kinolonlar tercih edilmektedir. Her ne kadar bu bakterilerde kinolon direnci yaygın olmasa da son yıllarda minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde artış görülmektedir. Plazmid aracılı kinolon direnci son yıllarda özellikle enterik gram-negatif basillerde saptanmıştır. Bu çalışmanın amacı, *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerinde plazmid aracılı kinolon direnç genlerinden *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* ve *qnrS* varlığının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Ocak 2011 - Aralık 2013 tarihleri arasında hastanemizin klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden izole edilen, 44 *Salmonella* ve 6 *Shigella* olmak üzere toplam 50 bakteri suşu alınmıştır. İzolatlar, konvansiyonel yöntemlerle ve Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi kullanılarak tiplendirilmiştir. Ayrıca izolatlar serotiplendirme de yapılmıştır. Suşların ampisilin, siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi, siprofloksasin MİK'leri ise E-test yöntemi ile çalışılmıştır. *QnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* ve *qnrS* varlığı PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Bulgular: İzolatların 38'i (%76) *Salmonella enteritidis*, 6'sı (%12) *Salmonella* spp. ve 6'sı (%12) *Shigella* spp. olarak tanımlanmıştır. İki (%4) *Shigella* spp. ile 1 (%2) *S. enteritidis* olmak üzere toplam 3 (%6) suşta *qnrS* açısından pozitiflik saptanmıştır. *QnrS* pozitif olan 3 izolatın 1'i siprofloksasine duyarlı, 2'si orta duyarlı; hepsi ampisilin ve SXT'e dirençli olarak bulunmuştur. *QnrS* pozitif izolatların E-test yöntemiyle siprofloksasin MİK değerlerine bakıldığında 0.06-0.5 ug/mL arasında olduğu görülmüştür.

Sonuç: *Shigella* ve *Salmonella* suşlarında, plazmidle aktarıldığı düşünülen *qnrS* varlığının toplam %6 oranında saptanmış olması, zaman içinde kinolon direncinin hızla yayılmasına ve gelişebilecek tedavi başarısızlıklarına neden olabileceğini düşündürmektedir.

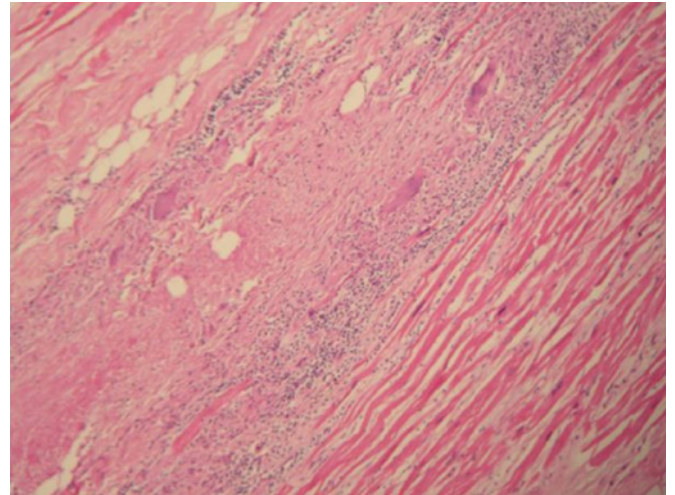
Anahtar sözcükler: *Salmonella*, *Shigella*, *qnr*

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, otopsi sonrası histopatolojik olarak TB ile uyumlu bulgular gösteren (Resim) 37 olgunun, parafine gömülü 40 doku örneği alınmıştır. Dokuların deparafinizasyon işleminden sonra DNA izolasyonu QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit (Qiagen, ABD) ile QIASymphony cihazında, DNA'nın amplifikasyon işlemi Artus *M. tuberculosis* RG-PCR kiti kullanılarak Rt-PCR yöntemiyle Rotor-GeneQ (Qiagen, ABD) cihazında yapılmıştır. Aynı şekilde deparafinizasyon işleminden sonra örneklerin izolasyon ve Rt-PCR işlemi Xpert MTB/RIF (Cepheid Inc, ABD) sistemiyle gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Parafine gömülü 40 doku örneğinin 16'sında (%40) *M. tuberculosis* DNA'sı her iki yöntemle de negatif bulunmuştur. Her iki yöntemle de pozitif bulunan örnek sayısı 13 (%32.5)'dir. Xpert yöntemiyle pozitif bulunan 7 (%17.5) örnek Qiagen sistemiyle negatif saptanırken, Qiagen sistemiyle pozitif bulunan 4 (%10) örnek Xpert yöntemiyle negatif saptanmıştır. Xpert MTB/RIF yöntemiyle pozitif bulunan 20 örneğin 15'i rifampisine duyarlı bulunurken, 3 örnekte rifampisin direnci saptanmış, 2'sinde ise direnç belirlenmemiştir (Tablo).

Sonuç: Postmortem TB enfeksiyonu tanısının konulması için etkin örneklemeye ile EZN boyama ve kültür yapılması önemlidir. Ancak postmortem mikrobiyolojik örneklemelerin yapılmadığı olgularda parafine gömülü dokularda *M. tuberculosis* DNA'sını göstermek, PCR sistemleri arasında farklılık olmakla birlikte tanı koydurucudur. Parafine gömülü dokularda çalışılan Xpert sistemi rifampisin direncini belirlemesi, daha kısa süre içinde ve daha fazla pozitif sonuç saptaması nedeniyle avantajlı olarak görülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, postmortem



Resim. Kalp dokusunda nekrotizan granümatöz iltihap (Hemotoksilen eozin, 20x).

PP - 075

Postmortem Tüberküloz Enfeksiyonu Tanısında Parafine Gömülü Dokularda İki Farklı Gerçek Zamanlı PCR Sisteminin Karşılaştırılması

Gülhan Yağmur¹, Nurhan Albayrak², Taner Daş¹, Muzaffer Yıldırım¹, Ayşe Özgün¹, Yalçın Büyük¹

¹İstanbul Adli Tıp Kurumu, Morg İhtisas Dairesi, İstanbul

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Tüberküloz (TB), dünyada halen morbidite ve mortalitesi yüksek olan enfeksiyonlardan biridir. Bu nedenle TB enfeksiyonları sonucu kaybedilen olguların postmortem tanımlanması önemlidir. Bu çalışmada, postmortem *M. tuberculosis* enfeksiyonu tanısında parafine gömülü dokularda iki farklı gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) sisteminin duyarlılıklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Tablo. Histopatolojik bulgular, Xpert ve Qiagen sistemi Rt-PCR bulgularının karşılaştırılması*

No	Örnek	Histopatoloji	Qiagen	Xpert MTB/RIF	RIF
1	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Negatif	Low	S
2	Kalp	Nekrotizan granülatöz iltihap	Negatif	Very low	I
3	Akciğer	Jelatinöz kazeöz pnömoni	Pozitif (CT: 28.1)	Medium	R
4	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 33.2)	Very low	R
5	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 34.2)	Negatif	
6	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 36.0)	Low	R
7	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 27.0)	Very low	S
8	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 29.0)	High	S
9	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 32.5)	Negatif	
10	Akciğer	Jelatinöz kazeöz pnömoni	Pozitif (CT: 28.2)	Low	S
11	Akciğer	Jelatinöz kazeöz pnömoni	Pozitif (CT: 31.1)	Medium	S
12	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 34.2)	Low	S
13	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 36.5)	Very low	S
14	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Negatif	Very low	I
15	Kalp	Nekrotizan granülatöz iltihap	Negatif	Very low	S
16	Akciğer	Jelatinöz kazeöz pnömoni	Pozitif (CT: 35.9)	Low	S
17	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Negatif	Very low	S
18	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Negatif	Low	S
19	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 32.5)	Negatif	
20	Akciğer	Jelatinöz kazeöz pnömoni	Pozitif (CT: 31.5)	Low	S
21	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 26.5)	Low	S
22	Akciğer	Nekrotik nodüller	Pozitif (CT: 33.0)	Very low	S
23	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Negatif	Very low	S
24	Akciğer	Nekrotizan granülatöz iltihap	Pozitif (CT: 27.7)	Negatif	

* Her iki yöntemle de pozitif bulunan olgular (n:13) koyu renkle gösterilmiştir.

Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli Gram-Negatif Basillerde Karbapenem Direncinin Moleküler Analizi

Mümtaz Güran¹, Farzad Haydari², Tülin Güven Gökmen², Melda Meral², Yıldız Kalaycı², Suna Kızılyıldırım², Fatih Köksal²

¹Yakındoğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşe, Kıbrıs
²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

Amaç: Karbapenemaz enzimleri, gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında bazen klinisyenlere tedavide seçenek bırakmayacak kadar tehlikeli, direnç spektrumu çok geniş olabilen enzimlerdir. Bu enzimleri sentezleyebilen bakteriler, günümüzde de hastanelerde görülen, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enfeksiyonların en başta gelen etkenleridir. Ülkemizde ise bu problemlerin etkileri klinikte ciddi bir şekilde hissedilmesine rağmen, günümüze dek yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada, lokal olarak karbapenemaz direncinin sürveyansı yapılırken, ülkemize epidemiyolojik veriler kazandırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Şubat 2012 - Mart 2013 tarihleri arasındaki bir yıllık süre zarfında, Çukurova, Başkent ve Mustafa Kemal Üniversiteleri Tıp Fakültesi Hastanelerinde, çeşitli klinik ve polikliniklerden gelen örneklerde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri taranmış; pozitifliğin tespit edildiği 168 örnekte antibiyotik duyarlılık testleri ile fenotipik olarak, PCR ve dizi analizi yöntemleriyle genotipik olarak karbapenemaz enzimleri araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen suşlar arasında (n: 168) penisilin, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları, sefalosporinler, ertapenem, imipenem ve trimetoprim/sülfametoksazole karşı direncin %80'in üzerinde olduğu; aztreonam, meropenem, gentamisin, tetrasiklin ve florokinolonlara karşı direncin %50-70 arasında değiştiği ve kolitsin direncinin %5.2 düzeyine ulaştığı izlenmiştir. Dirençli suşlar arasında en sık karşılaşılan karbapenemazlar OXA-48 ve OXA-58 gibi D grubu karbapenemazlar olup, bunları non-fermentatif mikroorganizmalarda görülen GES ve PER enzimleri ile bazı *Paeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* türlerinde görülen IMP, VIM, NDM gibi enzimler izlemektedir. VIM-7 enzimini sentezleyen suş ise ülkemizde ilk kez tanımlanmıştır.

Sonuç: Bölgemizdeki dirençli suşlarda karbapenemaz genlerinin çeşitliliği, global çeşitliliğe benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla, ülkemizin değişik bölgelerinde, daha fazla suş sayılarıyla yapılacak olan çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: Karbapenemaz, antibiyotik direnci

Kısa Dönemli *Acinetobacter baumannii* Salgını

Beril Akçimen¹, Tülin Güven Gökmen², Melda Meral², Cansu Önen², Tülay Kandemir², Yıldız Kalaycı², Suna Kızılyıldırım², Fatih Köksal²

¹Kadirli Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Osmaniye
²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

Acinetobacter baumannii özellikle yoğun bakım ünitelerinde sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara ve salgınlara yol açan önemli bir patojendir. Karbapenem grubu antibiyotikler dahil, çoklu ilaç direnci göstermesi enfeksiyonların tedavisinde ciddi problemlere sebep olmaktadır. Karbapenem direnci sıklıkla OXA tipi karbapenemazlarla oluşmaktadır. OXA tipi enzimler 4 alt grupta (OXA51, OXA58, OXA23, OXA24) toplanır. *Acinetobacter* izolatlarında OXA51 alt grubundaki enzimler intrinsik olarak bulunurken, mobil elementler ile kazanılan OXA58, OXA23 ve OXA24 alt grubu enzimler de beraberce bulunabilmektedir. Ayrıca *blaOXA51* geninin *upstream* bölgesinde yerleşen *ISAbal1* segmenti de transkripsiyonel bir promotör olarak β -laktamaz gen ekspresyonunu indüklemektedir.

Bu çalışmada Mart 2014 tarihinde Adana-Kadirli Devlet Hastanesinin 10 yataklı yoğun bakım ünitesinde, ventilatöre bağlı 3 hastanın trakeal aspiratından ve kaynak tespiti amacıyla alınan 4 çevresel örnekten (ventilatör hortum yüzeyi, ventilatör hortumu içi, ventilatör yüzeyi ve ventilatör tuşları) izole edilen karbapeneme dirençli *A.baumannii* izolatlarında, karbapenemaz enzimini kodlayan *blaOXA* genleri alt gruplarının, *ISAbal* segmenti varlığının ve PFGE yöntemi ile klonal ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, özgül primerler kullanılarak multipleks PCR ile, *blaOXA51*-benzeri gen için 353 bazçifti (bp), *blaOXA58*-benzeri gen için 599 bp, *blaOXA24*-benzeri gen için 246 bp ve *blaOXA23* geni için 501 bp büyüklüğünde; *ISAbal* segmentine yönelik olarak ise tek tüp PCR ile 548 bp boyutunda ampikon varlığı araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda, 3 hasta izolatu ve 4 çevresel örnekten izole edilen *A.baumannii*'nin PFGE paternleri %100 ilişkili bulunmuştur. İzolatların tamamında *blaOXA51* ve *blaOXA23* genleri ve ayrıca *ISAbal* segmentinin varlığı saptanmıştır. Hiçbir izolatta *blaOXA58*-benzeri ve *blaOXA24*-benzeri genler tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, yoğun bakım ünitesinde görülen kısa dönemli salgında, bulaşın çevresel kökenli olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *A.baumannii*, *blaOXA* geni

PP - 078

Bir Yalancı Salgın Analizi

Sinem Solmaz¹, Yasemin Işık Koç¹, Özlem Güzel Tunçcan², Murat Dizbay², Meltem Yalınay Çırak¹

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada, kemik iliği ünitesinde meydana gelen bir salgının tanımlanması ve kontrol önlemlerinin alınması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 2014 Mart ayında bir hafta boyunca kemik iliği ünitesinde yatan hastalardan rutin olarak alınan 13 adet kateter içi kan ve kan kültür örnekleri laboratuvarımıza gelmiştir. Kültürlerin değerlendirilmesinde, silik üreyen bakterilerin gram-pozitif kok/kokobasil morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterilerin tanımlanması klasik yöntemlerle yapılamamıştır. Kültürde üreyen bu bakterilerin tür tanımını yapabilmek için 16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile tüm kültürlerde *Microbacterium laevaniformans* saptanmıştır. Hastalarda herhangi bir semptom olmaması ve bu bakterinin rutin alınan kan kültürlerinde tespit edilmesi nedeniyle enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmemiştir. Geriye yönelik yapılan taramada, hastalardan kan kültürü alımı sırasında uygulanan yöntem hatasından dolayı kültürlerin kontamine olduğu kabul edilmiştir. Kültür alım yönteminin değiştirilmesi sonucunda kan ve kateter içi kan kültürlerinde herhangi bir bakteri üremesi saptanmamıştır.

Sonuç: Kemik iliği ünitesinde saptanan bu kümelenme yalancı salgın olarak değerlendirilmiştir. Klasik yöntemler ile tanımlanamayan, tanımlanması zor bu tip bakterilerin adlandırılmasında 16S rDNA dizi analizi uygun bir yöntemdir. Elde edilen bulgular, tanımlanamayan bakterilerde 16S rDNA dizi analizi yönteminin doğru tanıdaki önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: 16S rDNA dizi analizi, yalancı salgın analizi

PP - 079

Bir Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen *Sphingomonas paucimobilis* Suşlarının Mikrobiyolojik Açından Değerlendirilmesi

Tuğba Kula Atik, Bayhan Bektöre, Mehmet Burak Selek, Ümit Karakaş, Orhan Baylan, Mustafa Özyurt

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

Amaç: *Sphingomonas paucimobilis* aerobik, non-fermentatif, oksidaz ve katalaz pozitif gram-negatif bir basildir. Hastanelerde görülen kısa süreli salgınlarda, etken mikroorganizmalar arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek amacıyla ilk olarak başvurulan yöntem AP-PCR tekniğidir. Çalışmamızda hastanemizin Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesinde izole edilen *S.paucimobilis* suşlarının mikrobiyolojik açıdan fenotipik ve genotipik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yoğun bakım ünitesinde bir aylık dönem içinde 3 farklı hastada *S.paucimobilis* üremiştir. Bulaş kaynağını belirlemek üzere çevresel örneklemeler yapılmıştır. *S.paucimobilis*'in mikrobiyolojik tanısı konvansiyonel yöntemler ve Vitek-2 otomatize tanımlama sistemi (bioMerieux, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların antibiyotiklere duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. DNA izolasyonu spin kolon yöntemi ile yapılmış ve AP-PCR için M13 primerinin kullanıldığı protokol uygulanmıştır.

Bulgular: Hastaların hepsinden ve çevresel örnekler arasında 5 oksijen haznesinden izole edilen toplam 8 izolatu antibiyotik duyarlılık durumları fenotipik olarak benzer bulunmuştur. AP-PCR sonucunda ise, oksijen haznelerinden izole edilen 5 izolatu kendi aralarında ve 3 hastanın 2'sinden izole edilen izolatların da kendi aralarında bant dizilimleri benzerlik göstermiştir.

Sonuç: Oksijen haznelerinden izole edilen izolatlar ile hastalardan izole edilen izolatlar arasında bant dizilimleri açısından benzerlik görülmemiştir. Benzer bant dizilimi görülen 2 hastanın ortak özelliği aynı yatakta birer hafta aryla yatmalarıdır. Ancak yatak kenarlarında üreme olmadığı için bulaş kaynağının ne olduğu tam olarak bulunamamıştır. PFGE yöntemi, genotiplendirme yöntemi içinde altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, kısa süreli salgınların ilk basamağında hızlıca AP-PCR çalışılması önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: AP-PCR, *Sphingomonas paucimobilis*

PP - 080

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Vankomisine Dirençli Enterokokların Fenotipik ve Genotipik Olarak İncelenmesi

Sevim Özsoy, Zeynep Arzu İli, Güner Söyletir

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Amaç: Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden etken olarak izole edilen vankomisine dirençli enterokok (VRE)'lerin retrospektif olarak değerlendirilmesi ve dirençten sorumlu genlerin araştırılması amaçlanmıştır.

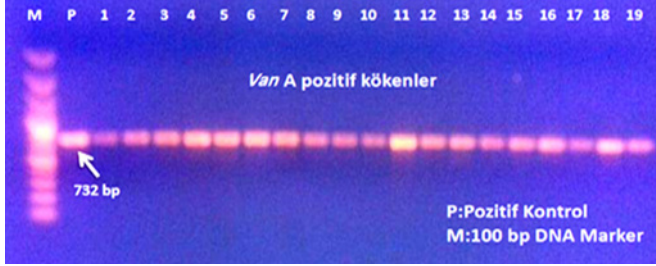
Gereç ve Yöntem: Çalışmaya hastanemizde Ocak 2012-Nisan 2014 tarihleri arasında çeşitli servislerdeki hastaların klinik örneklerinden izole edilmiş, vankomisine dirençli olduğu belirlenmiş 49 izolat (idrara, kan, plevra, periton, yara sürüntüsü, biyopsi, derin trakeal aspirat) dahil edilmiştir. Enterokoklar, konvansiyonel yöntemler ve Maldit-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) E-test yöntemiyle çalışılmıştır. Genotipik incelemede ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile özgül primerler kullanılarak *VanA* ve *VanB* direnç genleri araştırılmıştır.

Bulgular: Bu dönemde yatan hastaların klinik örneklerinden 1.123 *Enterococcus* spp. üretilmiş, bunların 49'u (%4.3) VRE olarak saptanmıştır. Bu suşların 43'ü *E.faecium*, 6'sı *E.faecalis* olarak tanımlanmıştır. İzolatlar vankomisin (32->=256) ve teikoplanine (16->=256) değişik düzeyde dirençli bulunmuştur. Fenotipik yöntemlerle VanA

tipinde (vankomisin ve teikoplanin dirençli) olduğu belirlenen 49 kökenin 48'inde *VanA* geni için özgül 732 bazcifti (bp) büyüklüğünde amplifikasyon ürünü görülmüştür (Şekil). Ancak idrardan izole edilen bir *E.faecium* kökeninde *vanA* fenotipi (vankomisin>=256, teikoplanin>=256) göstermesine karşın PCR ile *VanA* direnç geni saptanmamıştır. *VanB* primeri ile yapılan PCR sonucunda ise hiçbir köken amplifikasyon ürününe rastlanmamıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, *E.faecium* kökenlerindeki direnç genlerine bakıldığında 48 kökende (%97.9) saptanan *VanA* direnç genine karşın, hiçbir kökende *VanB* direnç geni saptanmamış olması ülkemiz verileriyle uyumlu olmakla birlikte, VRE olarak tanımlanıp *VanA* fenotipine uygun olan bir kökende *VanA/B* genlerinin saptanmamış olması, bu tür kökenlerin aydınlatılması için ileri çalışmalara gereksinim olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: Polimeraz zincir reaksiyonu, vankomisine dirençli enterokok



Şekil. Bazı *VanA* gen bölgelerinin PCR ürünlerinin %1.5'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

PP - 081

Enterobacteriaceae Üyelerinde Karbapenem Direnci ve Dirençten Sorumlu Enzimlerin Varlığının Araştırılması

Aslı Bulut¹, Gülşah Aşık¹, Cengiz Demir¹, Halil Er³, Mustafa Altındış², Recep Keşli¹

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

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

³Muş Devlet Hastanesi, Muş

Amaç: Karbapenemazlar, en güçlü hidrolitik aktiviteye sahip beta-laktamazlardır. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenem direncinden en sık KPC, NDM, OXA-48 ve OXA-58 karbapenemazlar ve VIM, IMP gibi metallo-beta-laktamazların sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen üç *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi bakteride karbapenem direnci ve dirençten sorumlu karbapenemaz enzimlerinin genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: alışıma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesine başvuran hastalara ait, rutin kapsamında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 138 *K.pneumoniae*, 52 *E.coli* ve 47 *Enterobacter* spp. olmak üzere toplam 237 *Enterobacteriaceae* üyesi dahil edilmiştir. Bakteri tanımlaması ve antibiyotik duyarlılık testleri geleneksel yöntemler ve otomatize sistemler ile (Phoenix100, BD, ABD) gerçekleştirilmiştir. Suşların KPC, VIM, IMP, NDM ve OXA-48 karbapenemazları kodlayan gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır.

Bulgular: İzolatların %19.4'ünde (33 *K.pneumoniae*, 7 *E.coli* ve 6 *Enterobacter* spp.) karbapenemlerden en az birine direnç ya da azalmış duyarlılık tespit edilmiştir. Karbapeneme dirençli izolatların %89.1'inde karbapenemaz kodlayan genlerden en az biri saptanmıştır. Karbapenemaz genlerinin 26'sının *blaOXA-48* (21 *K.pneumoniae*, 2 *E.coli* ve 3 *Enterobacter* spp.), 21'inin *blaVIM* (19 *K.pneumoniae*, 2 *Enterobacter* spp.), 11'inin *blaIMP* (10 *K.pneumoniae*, 1 *Enterobacter* spp.) ve 1'inin *blaNDM-1* (*K.pneumoniae*) olduğu gözlenmiştir. KPC ve OXA-58 enzimine rastlanmamıştır.

Sonuç: Çalışmada, karbapenem direncinin özellikle *K.pneumoniae* izolatlarında en yüksek oranda saptandığı, hastanemizde izole edilen *Enterobacteriaceae* türleri arasında karbapenem direncinden sorumlu primer enzimin OXA-48 olduğu, ancak metallo-beta-laktamazların da oldukça sık bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca hastanemizde ilk kez NDM-1 karbapenemaz enzimi üreten *K.pneumoniae* izolatı saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Enterobacteriaceae*, karbapenemazlar

PP - 082

Stenotrophomonas maltophilia'da Farklı Sınıflardaki İntegronların Varlığının ve Antibakteriyel Dirençle İlişkilerinin Belirlenmesi

Eğemen Usta¹, Cafer Eroğlu¹, Keremettin Yanık¹, Adil Karadağ¹, Akif Koray Güney², Murat Günaydın³

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

²Atatürk Göğüs ve Göğüs Cerrahisi Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesi

³İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Amaç: *Stenotrophomonas maltophilia* sık izole edilen ve hastane enfeksiyonlarında giderek artan öneme sahip olan fırsatçı patojenlerdendir. Pek çok farklı mekanizmayı kullanarak geniş spektrumlu antibiyotiklerin çoğuna direnç gösterir. Bu durum, klinikte tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. İntegron ve plazmidler antibiyotik direnç genlerinin aktarımında rol alan mobil genetik elemanlardır. Sınıf 1 integronlar başta olmak üzere, farklı gram-negatif bakterilerde antibiyotik direnci ile olan ilişkisi irdelenmiş olmasına rağmen, özellikle *S.maltophilia* için ülkemizdeki veriler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, *S.maltophilia* izolatlarında antibiyotik direncinden sorumlu integronların araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Klinik örneklerden izole edilen 100 *S.maltophilia* suşunun seftazidim, trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), kloramfenikol ve levofloksasin duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. İntegron sınıf 1, 2, 3 ve integron 5'-3' korunmuş gen bölgeleri ise polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. Plazmid varlığı Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir.

Bulgular: Suşların %24'ü seftazidim, %66'sı kloramfenikol, %93'ü SXT ve %95'i levofloksasine duyarlı olarak saptanmıştır. Amplifiye edilen ürünlerin dizi analizleri yapıldığında, suşların %12'sinde integron varlığı gösterilmiştir. İntegrona ek olarak; kuartern amonyum direnç protein geni, aminoglikozid adeniltransferaz geni ve integronla ilişkili rekombinasyon bölgesi varlığı tespit edilmiştir. Suşların %9'unda çeşitli boyutlarda plazmidler de saptanmasına rağmen bunların hiçbirinde integron varlığı gösterilememiştir.

Sonuç: *S.maltophilia* suşlarının seftazidim ve kloramfenikol duyarlılıkları düşük olmasına rağmen SXT ve levofloksasine duyarlılıkların hala yüksek oranda olduğu görülmüştür. Ayrıca hastanemizdeki dirençli *S.maltophilia* suşlarının yayılım mekanizmasında integron (%12) ve plazmidlerin (%9) rol oynadığı kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Stenotrophomonas maltophilia*, integron

PP - 083

Steril Vücut Sıvılarında Üreyen Mikroorganizma Türlerinin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Mesut Bulut, Yusuf Afşar, Mustafa Çağatay, Ümmü Gül Erdem

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada, 2013 yılında Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen steril vücut sıvısı örneklerinde üreyen mikroorganizma türlerinin ve oranlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Laboratuvarımıza 2013 yılında gönderilen steril vücut sıvısı örneklerine ait kültürler (kan, plevral mayi, periton mayi, perikard mayi, sinoviyal mayi, beyin omurilik sıvısı), labora-

tuvar kayıt sistemleri (ees SARUS LIS, Türkiye; Sisoft Otomasyon Sistemleri, Türkiye) ile retrospektif olarak taranmıştır. Üreme görülen tüm örnekler çalışmaya dahil edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Toplam 3.542 hastadan gönderilen 7.430 steril vücut sıvısı örneğinin 795'inde (%10.6) üreme olduğu görülmüştür. En sık saptanan ilk üç bakteri sırasıyla; koagülaz negatif stafilkoklar (n: 300; %37.7), *Acinetobacter* spp. (n: 113; %14.3) ve enterokok türleri (n: 90; %11.3) olmuş; bunları *E.coli* (n: 73; %9.2), *Klebsiella* spp. (n: 50; %6.3), koagülaz pozitif stafilkoklar (n: 50; %6.3), *Pseudomonas* spp. (n:38; %4.7), *Candida* spp. (n:23; %2.8), streptokok türleri (n: 17; %2.2) ve diğerleri (n: 41; %5.2) izlemiştir.

Sonuç: Hastanemiz verileri incelendiğinde, steril vücut sıvısı örneklerinde en sık karşılaşılan bakterilerin, tüm dünyada olduğu gibi çoklu antibiyotik direncine sahip türler olduğu gözlenmiştir. Bu örneklerin çoğu yatarak tedavi gören hastalara ait olup, bu hastaların büyük bir kısmı halen hastanemizde nozokomiyal enfeksiyon tanısı ile izlenmektedir. Dolayısıyla, hastane enfeksiyonlarının takibi ve kontrol altında tutulabilmesi için veri takibi ve sürekliliği büyük önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Steril vücut sıvısı, kültür

PP - 084

Anti-Parietal Hücre Antikoru Pozitifliğinin Vitamin B12 Eksikliğini Saptamadaki Etkinliğinin Araştırılması

Emel Çalışkan¹, Ayşe Dede², Gülsüm Biten Güven¹, Asiye Altınöz Aytaç¹, Elif Kaş¹, Özlem Doğan³

¹Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
²Buldan Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Denizli
³Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Anti-parietal hücre antikoru (APA), otoimmün atrofik gastritin patogeneğinde rol oynamaktadır. Atrofik gastritin ise vitamin B12'nin bağırsaklardan emilimini önleyerek eksikliğe neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada APA pozitifliğinin vitamin B12 eksikliğini saptamadaki etkinliği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Laboratuvarımıza, Mart 2013-2014 tarihleri arasında anti-düz kas antikoru (ASMA) değerlendirmesi için gönderilen serum örnekleri indirekt immüno floresan (IIF) (Euroimmun, Almanya) yöntemi ile incelenmiştir. Değerlendirme alanında parietal hücrelerde floresan yoğunluğu tespit edilen hastaların vitamin B12 düzeyleri retrospektif olarak araştırılmıştır. Ayrıca parietal hücrelerde floresan yoğunluğu tespit edilmeyen hastaların da vitamin B12 düzeyleri kaydedilmiş ve iki grup arasında fark olup olmadığı incelenmiştir.

Bulgular: Çalışmaya APA pozitif olan ve vitamin B12 düzeyleri bilinen 30 hasta ile APA negatif olan ve vitamin B12 düzeyleri bilinen 30 hasta dahil edilmiştir. APA pozitif olan grubun vitamin B12 ortalaması 458 pg/mL, APA negatif olan grubun 347 pg/mL olarak bulunmuş olup, her iki grubun vitamin B12 düzeylerinin benzer olduğu görülmüştür.

Sonuç: APA pozitifliği, atrofik gastrit tanısını destekleyen bir bulgu olmakla birlikte, normal popülasyonda da karşımıza çıkabilmektedir. Çalışmamızda gruplar arasında fark olmamasına rağmen daha fazla sayıda hasta gruplarıyla yapılan ve pozitiflik saptanan hastaların belirli aralıklarla takiplerinin yapılarak vitamin B12 düzeylerinin incelendiği çalışmaların, APA'nın erken tanıdaki etkinliğini araştırmada önemli olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca otoimmün hepatit düşünülerek ASMA değerlendirmesi istenen hastalarda APA pozitifliklerinin de bildirilmesi, otoimmün hastalıkların birlikte görülme oranları düşünüldüğünde klinisyene yol gösterici olacaktır.

Anahtar sözcükler: Anti-parietal hücre antikoru, vitamin B12

PP - 085

Helicobacter pylori Enfeksiyonunun Teşhisi İçin Rekombinant CagA (rCagA) Proteini ve Anti-rCagA Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

Barık Salih¹, Cebrail Karakuş¹, Merve Uslu¹, Duygu Yazıcı¹, Zeynep Ulupınar¹, Fahri Akbaş²

¹Fatih Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul
²Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Helicobacter pylori enfeksiyonu gastrit, peptik ülser ve mide kanserine sebep olmaktadır. Patogeneşte en önemli virülans faktörlerinden biri olan *cagA* geni, immünodominant bir CagA proteini kodlamaktadır. *H.pylori* enfeksiyonunun teşhisi endoskopi ile invazif olarak yapılmaktadır. ELISA ve Western blot (WB) gibi invazif olmayan testler, serumda antikorları tespit ederek teşhiste yardımcı olmaktadır. Mevcut test kitlerinde, bu antikorların tespiti için genellikle bakteri lizati kullanılmaktadır. Ancak daha özgül ve etkin tanı için saf bir rekombinant CagA (rCagA) proteinine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, rCagA proteini üretmek için *cagA* geninin klonlanması, rCagA'ya karşı monoklonal antikorların geliştirilmesi ve bu ürünlerin *H.pylori* enfeksiyonunun tanısındaki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, *cagA* geninin 5' korunmuş bölgesi klonlanmış ve 67 kDa bir rCagA proteini elde edilmiştir. CLUSTAL 2.1 çoklu dizi hizalama programı kullanılarak, klonlanan *cagA* geninin DNA dizisi ile onun aminoasit dizisi belirlenmiş; elde edilen dizilerin *H.pylori* 26695 referans suşu ile sırasıyla %92 ve %91 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Anti-rCagA monoklonal antikorları ise hibridoma teknolojisi ile geliştirilmiş ve antikor izotipinin IgG2b olduğu saptanmıştır. Bu monoklonal antikorun, elde edilen rCagA'yı tanıdığı ELISA ve WB yöntemiyle doğrulanmıştır. Bununla birlikte mevcut ticari monoklonal antikorların, bizim ürettiğimiz rCagA'yı tanıdığı da aynı yöntemlerle tespit edilmiştir.

Geliştirdiğimiz ilk rCagA proteini ve anti-rCagA monoklonal antikor, ELISA, WB, lateral akım test çubuğu, immünohistokimya gibi tanı ve araştırma amaçları için kullanılabilir. Dolayısıyla bu rekombinant antijen ve monoklonal antikorların kullanıldığı yöntemler, *cagA*-pozitif *H.pylori* suşlarının araştırılmasıyla, peptik ülser ve mide kanseri gelişimi riskini belirlemede ve önlemede daha güvenilir olacaktır.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, rekombinant CagA

PP - 086

Helicobacter pylori cagA Geni Filogenetik Analizi ve Enfeksiyonları Arasındaki İlişki

Barık Salih¹, Bora Kazım Bölek², Mehmet Taha Yıldız¹, Soykan Arıkan³

¹Fatih Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul
²İstanbul Esenyurt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul
³İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Cerrahi Bölümü, İstanbul

Helicobacter pylori'ye ait önemli virülans faktörlerinden birisi de *cagA* genidir. Bu genin 5' ucunda bulunan korunmuş bölgedeki değişikliklerin, farklı *H.pylori* suşları arasındaki filogenetik ilişkiyi ve bunların peptik ülserle olan bağlantısını yansıttığı düşünülmektedir. Farklı coğrafi bölgelerden elde edilen *H.pylori* izolatları arasında önemli farklılıklar görüldüğü belirtilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de elde edilen *H.pylori* izolatları ile farklı coğrafi bölgelerden elde edilen *H.pylori* izolatlarını karşılaştırmak ve sonuçların gastrit ve peptik ülser ile bağlantısını araştırmaktır.

Çalışmaya 19'u Türkiye, 33'ü de diğer farklı coğrafi bölgelerden olmak üzere toplam 52 izolat dahil edilmiştir. On dokuz Türk hastadan (12 gastrit ve 7 peptik ülser hastası) elde edilen antral mide biyopsileri kullanılarak *cagA* 5' bölgesi PCR ile çoğaltılmış ve DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan filogenetik analiz sonucunda oluşturulan ağacın üç gruba ayrıldığı gözlemlenmiştir. Bunlar; A) "Asian"

ile "African/Anatolian/Asian/European" isimli iki alt grup içeren karışık (mixed) grup, B) "Anatolian/European" grubu ve C) "American-Indian" olarak isimlendirilmiş gruplardır. Türkiye'deki gastritli hastalardan elde edilen diziler büyük oranda alt-grup A ile kümeleşirken, peptik ülser hastalarından köken alan dizilerin B grubu ile kümeleştiği görülmüştür. Türk hastalardan elde edilen izolatlar için yapılan filogenetik analiz, gastrit ve ülser hastaları arasında farklı özellikler olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda, gastrit izolatlarının 2/3'ünün kendi aralarında kümelendiği, 1/3'ünün ise ülser izolatları ile birlikte kümelendiği belirlenmiştir. Sadece ikinci grupta bahsedilen gastrit izolatları ile ülser izolatları arasında birkaç aminoasidin paylaşıldığı bulunmuştur.

Bu çalışma, farklı coğrafi bölgeler ve onların *H.pylori* izolatları arasındaki ilişkiye işaret etmekte, bizim *H.pylori* izolatlarındaki *cagA* genleri profiline yeni bir bakış açısı sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, filogenetik analiz

PP - 087

***Helicobacter pylori*'den Üretilen Rekombinant CagA Proteinini Üzerindeki Epitopların Monoklonal Antikorlar Kullanılarak Belirlenmesi**

Merve Uslu¹, Cebrail Karakuş¹, Zeynep Ulupınar¹, Fahri Akbaş², Barik Salih¹

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

²Bezm-i Alem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Protein epitopların özgül antikorlar ile tanınması, antijen-antikor etkileşiminin önemli bir basamağıdır. Bu epitopların tespiti; bağlanma yerlerinin belirlenmesine, farklı antikorlar arasında çapraz reaksiyonun anlaşılmasına ve bu antikorların araştırma ve tanı amaçlı kullanılmasına yardımcı olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *H.pylori*'nin *cagA* geni 5' korunmuş bölgesinin klonlanması, farklı moleküler ağırlıkta rekombinant CagA (rCagA) proteinlerinin geliştirilmesi ve bu proteinlerdeki epitop bölgelerinin kendi ürettiğimiz anti-rCagA monoklonal antikor (Mab)'lar ve ticari Mab'lar kullanılarak belirlenmesidir.

Çalışmamızda, rekombinant plazmid "pET28a(+)-rCagA", *E.coli*'den saflaştırılmış ve bu plazmiddeki restriksiyon kesim yerleri SnapGene programı ile belirlenmiştir. Plazmid vektörü SpeI, AvrII ve XhoI restriksiyon enzimleri ile 3 farklı yerden kesilmiş ve vektörün kendisine ligasyon yapılarak *E.coli* hücrelerine aktarılmıştır. IPTG (isopropylthio-β-galactoside) indüksiyon sonucu 28 kDa, 60 kDa ve 67 kDa moleküler ağırlıkta 3 rCagA proteini elde edilmiştir. 28 kDa rCagA proteininde 6; 60 kDa rCagA proteininde 11 ve 67 kDa rCagA proteininde ise 14 tahmini epitop olduğu "Emini Surface Accessibility Prediction" yazılımı ile belirlenmiştir. Bu epitopların yerlerinin saptanması, bizim ürettiğimiz anti-rCagA Mab (BS-53) ve 3 ticari anti-CagA Mab (A-10, B818M, B237H) kullanılarak Western blot (WB) yöntemi ile yapılmıştır.

Sonuç olarak, ürettiğimiz BS-53 tüm rCagA proteinlerinin ilk 248 aminoasit dizisi içinde bir epitopu tanımıştır. A-10, 60 kDa ve 67 kDa rCagA proteinlerinin 248 ile 469'uncu aminoasit dizisi içindeki bir epitopu tanıırken B818M ve B237H, 67 kDa rCagA proteininin 469 ile 594'üncü aminoasit dizisi içinde bir epitopu tanımıştır. His-probe Mab'ın WB analizinde kullanılması, rCagA proteinlerinin 6xHis işaretli olduğunu doğrulamıştır. Bu çalışma, geliştirdiğimiz BS-53 Mab'ların, rCagA proteininin farklı bir bölgesinde bulunan ve diğer Mab'lar ile çapraz reaksiyon vermeyen bir epitopu tanıdığını ve bu Mab'ların ileride araştırma ve tanı amacıyla kullanılabilceği göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, epitop belirleme

PP - 088

CagA-Pozitif *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Serolojik Tanısı İçin Anti-CagA Antikorlarının Tespit Eden Orijinal Bir Dolaylı ELISA Geliştirilmesi

Duygu Yazıcı¹, Cebrail Karakuş¹, Zeynep Ulupınar¹, Fahri Akbaş², Cansel Türkay³, Nizamettin Bayyurt⁴, Barik Salih¹

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

²Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Gastroenteroloji Bölümü, Ankara

⁴Fatih Üniversitesi, İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi, İşletme Bölümü, İstanbul

Helicobacter pylori enfeksiyonunun teşhisi genelde invazif (endoskopi) yöntemler ile konulmaktadır. Ayrıca serolojik testlerle (invazif olmayan) dolaylı olarak bu enfeksiyonun tespit edilebilir. Bu bakterinin en önemli virülans faktörlerinden biri *cagA* geninin kodladığı CagA proteindir. *cagA*-pozitif *H.pylori* suşları mide ve duodenum ülserleriyle mide kanseri oluşumunda büyük bir rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı, kendi ürettiğimiz rekombinant CagA (rCagA) proteinini kullanarak, enfekte olguların serumlarında anti-CagA antikorlarının saptanması için orijinal bir dolaylı ELISA yöntemi geliştirmektir.

Çalışmaya, 59 hastadan alınan mide biyopsisi ve serum örnekleri dahil edilmiştir. *H.pylori* varlığı biyopsilerde PCR ve hızlı ureaz testi ile belirlenmiştir. ELISA plağı rCagA ile kaplanıp toplanan serumlar ile inkübe edilmiş; enzim bağlı ikinci antikor (konjugat) ile muamele edildikten sonra substrat eklenerek serumlardaki anti-CagA antikor düzeyi spektrofotometrik olarak ELISA okuyucusunda saptanmıştır. Anti-CagA antikorları, 38 gastritli hastanın %74'ünde, 8 duodenum ülserli hastanın %100'ünde, 9 mide ülserli hastanın %67'sinde ve 4 mide kanserli hastanın %50'sinde pozitif olarak bulunmuştur. Alınan sonuçlar *cagA* PCR sonuçları ile kıyaslanarak ROC analizi yapılmıştır. Sınır (cut-off) değeri, Youden indeksi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre, geliştirilen testin serumda anti-CagA antikorlarını tespit etmek için oldukça duyarlı (%98) ve özgül (%71) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca testin pozitif prediktif değeri %92, negatif prediktif değeri %91 ve doğruluğu %92 olarak tespit edilmiştir. Serumlar aynı zamanda ticari bir ELISA kiti ile de test edilerek geliştirdiğimiz testin doğruluğu kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak bu test, enfekte hastalarda *cagA*-pozitif *H.pylori* suşlarını teşhis ederek hastalığın ilerlemesini engelleyecek tedavinin uygulanmasını ve aynı zamanda *H.pylori* eradikasyonunun takibinin yapılmasını sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, ELISA

PP - 089

CagA-Pozitif *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Teşhisi İçin Orijinal Bir Lateral Akım Test Çubuğu

Cebrail Karakuş¹, Zeynep Ulupınar¹, Fahri Akbaş², Barik Salih¹

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

²Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Helicobacter pylori enfeksiyonu dünya nüfusunun %50'sinde görülmektedir. Bakteriye *cagA* geni (cytotoxin-associated gene) oldukça immünodominant CagA antijenini kodlamaktadır. CagA-pozitif *H.pylori* suşları, en ciddi mukoza lezyonlarına yol açarak mide ve duodenum ülserleriyle mide kanseri oluşumunda etkilidir. Endoskopi ile alınan mide biyopsilerinde *H.pylori cagA* geninin varlığı PCR ile belirlenebilmektedir. Bu gibi invazif yöntemler pahalı, zaman alıcı ve zahmetlidir. Ancak invazif olmayan yöntemlerden olan serolojik testler ile, *cagA* geninin varlığı dolaylı olarak serumdaki anti-CagA antikorlarının tespitiyle değerlendirilebilir. Bu çalışmanın amacı, kendi hazırladığımız rekombinant CagA (rCagA) proteini ve anti-rCagA monoklonal antikor (Mab) kullanarak, enfekte hastaların serumlarında anti-CagA antikorlarının tespiti için orijinal bir lateral akım test çubuğu (LATÇ) geliştirmektir.

Çalışmamızda, rCagA proteini, altın nanoparçacık üzerine kaplanmış ve konjugat pede yerleştirilmiştir. İşaretlenmemiş rCagA test çizgisine ve anti-rCagA Mab kontrol çizgisine sabitlenmiştir. Örnek pedine damlatılan, anti-CagA antikoları içeren örnek sıvısı konjugat pede hareket ederek burada altın nanoparçacık işaretli rCagA'ya bağlanmıştır. Membranda lateral akımla ilerleyen bu immünokompleks test çizgisinde rCagA tarafından yakalanarak kırmızı bir çizgi oluşturmuştur. Örnek sıvısı kontrol çizgisine doğru ilerlemiş ve burada anti-rCagA Mab tarafından yakalanan serbest altın nanoparçacık bağlı rCagA kırmızı bir çizgi oluşturmuştur. Geliştirdiğimiz bu test, *H.pylori* enfeksiyonlarında, bakterinin kuvvetli patojenik faktörü (CagA) olup olmadığını tespit edebilecektir. Böylece gastrit hastalarında cagA-pozitif *H.pylori*'nin peptik ülser ve mide kanserine yol açmasını engellemek için uzmanlar tarafından hedefe yönelik tedavinin yapılması sağlanarak büyük bir sağlık ekonomisi temin edilecektir. Dünyada ilk olarak serumda anti-CagA antikolarını tespit eden bu LATÇ hızlı, teçhizat gerektirmeyen, ucuz, kullanımı kolay, uzun raf ömürlü, çok hassas ve özgün olma avantajlarına sahiptir.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, lateral akım test çubuğu

PP - 090

Anti-Nükleer Antikor (ANA) Tespitinde Kullanılan İndirekt İmmüno Floresans ve İmmüno Blot Testlerinin Karşılaştırılması

Mesut Bulut, Yusuf Afşar, Zeynep Dansuk, Ümmü Gül Erdem

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada, Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İmmünoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerde, anti-nükleer antikor (ANA) tespitinde kullanılan indirekt immüno floresans (IFA) ile immüno blot (İB) testlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hastanemiz İmmünoloji Laboratuvarına Temmuz 2013-Aralık 2013 tarihleri arasında gönderilen ve her iki testin de uygulandığı toplam 746 örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerle, ImmüGlo ANA Hep-2 Substrate (IMMCO Diagnostics, ABD) kiti kullanılarak üreticinin yönergelerine göre IFA testi uygulanmış ve sonuçlar floresans mikroskobu (HumaScope Fluo, Almanya) ile tecrübeli üç kişi tarafından değerlendirilmiştir. İB testi ise, ANA-LIA Maxx Line Immunoassay (IMTEC, Almanya) kiti kullanılarak yarı otomatize cihazda (MedTec Biolab Equipment, ABD) uygulanmış; yine tecrübeli üç kişi tarafından sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm sonuçlar IFA yöntemi patern sonuçlarına göre gruplandırılarak İB test sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya alınan 746 örneğin 343'ünde (%46) her iki test de negatif sonuç vermiştir. İFA yönteminde en sık görülen üç patern sırasıyla; granüler (%28), homojen (%8) ve sentromerik (%3) olarak bulunmuştur. Üç patern de İB testi sırasıyla %37, %36 ve %70 negatiftir. Karşılaştırmalı sonuçlar tabloda özetlenmiştir.

Sonuç: İFA testi ANA değerlendirmesinde altın standarttır. Çok sayıda örneğin test edilememesi ve değerlendirmesinde tecrübeli kişilere ihtiyaç duyulması gibi dezavantajlara sahip olsa da, 100'den fazla antikor İFA testi ile taranabilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız İB kitinde sadece 17 antikor taranabilmektedir. İFA pozitif olarak değerlendirdiğimiz örneklerin çoğu İB testinde negatif bulunmuştur. Negatif sonuçların, İB testinin birçok ANA tipini tespit edememesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yine pozitif örneklerde yüksek oranda korelasyon görülmesi de bu düşüncemizi desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: Antinükleer antikor, indirekt immüno floresans

Tablo. ANA tespitinde kullanılan İFA ve İB test sonuçlarının karşılaştırılması

İFA ile ANA Paterni (Örnek sayısı)	İmmüno Blot Sonucu (Örnek sayısı)
Granüler Patern (233)	Negatif (92) Anti-SSA (42) Anti-SSB (20) Anti-KU (14) Nükleozom (11) Histon (11) Anti-SmRNP (10) SmD1 (2) Diğer (32)
Homojen Patern (63)	Negatif (20) Anti-dsDNA (10) Anti-SSA (5) Anti-SSB (4) Anti-KU (6) Nükleozom (6) Histon (6) Diğer (6)
Sentromerik Patern (15)	CENP-B (11) Anti-SSB (3) Negatif (1)
Diğer Paternler (28)	Negatif (23) Anti-dsDNA (1) Anti-Ku (1) Diğer (2)
Negatif Örnekler (64)	Anti-Ku (15) Mi-2 (16) Anti-SSA (8) Anti-SSB (7) Anti-dsDNA (5) PCNA (5) Anti-SmRNP (3) Diğer (12)

PP - 091

Bir Yıllık Süre İçerisinde Anti-Nükleer Antikor Pozitifliklerinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi

Gülsüm Biten Güven¹, Emel Çalışkan¹, Ayşe Dede², Asiye Altınöz Aytar¹, Elif Kaş¹

¹Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

²Buldan Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Denizli

Sistemik veya organa özgül otoimmün hastalık düşünülen olguların tanısında yaygın olarak kullanılan anti-nükleer antikor (ANA) testleri, tarama testi olarak değerini korumaktadır.

Bu çalışmada, 1 Mart 2013 - 28 Şubat 2014 tarihleri arasında Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen 655 hasta serumunda çalışılan ANA testlerinin sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir.

Çalışmamızda ANA testi, indirekt immüno floresans yöntemi ile (IIFT, Euroimmun, Almanya) HEP-2 ve maymun karaciğer dokuları kullanılarak 1/100 dilüsyonda çalışılmış ve örnekler boyanma paterni ve floresans boyanma şiddetine göre değerlendirilmiştir. ANA sonucu pozitif saptanan 132 hastanın 106'sı (%80) kadın, 26'sı (%20) erkek olup, yaş dağılımı; 14'ü (%10) 1.dekad, 22'si (%17) 2. dekad, 24'ü (%18) 3.dekad, 15'i (%11) 4.dekad, 16'sı (%12) 5.dekad, 21'i (%16) 6.dekad, 9'u (%0.7) 7.dekad, 8'i (%0.6) 8.dekad ve 3'ü (%0.2) 9.dekad olarak saptanmıştır. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımları ise; 28'i (%21) pediatri, 50'si (%38) dahiliye, 24'ü (%18) fizik tedavi ve rehabilitasyon, 7'si (%5) dermatoloji ve 23'ü (%17) diğer (ortopedi, intaniye, kardiyoloji, vb.) klinikler şeklindedir. ANA boyanma paternleri değerlendirildiğinde; 55'i (%42) granüler, 11'i (%8) nükleolar, biri (%0.7) homojen, biri (%0.7) sentromer, biri (%0.7) nükleer membran, biri (%0.7) spindle apparatus, biri (%0.7) nükleer benekli, 25'i (%19) granüler ve granüler kromozom, 18'i (%14) homojen ve granüler, 18'i (%14) ise diğer karışık paternler olarak saptanmıştır. Floresans boyanma şiddetine göre örneklerin;

52'si (%39) bir pozitif, 21'i (%16) iki pozitif, 8'i (%6) üç pozitif ve 51'i (%39) sınırda/şüpheli pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak ANA pozitifliği, çoğunlukla tanısız değildir ve test sonucunun klinik bulgularla birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Otoimmün hastalık düşünülen ve ANA testi pozitif olarak saptanan hastalarda ileri otoantikör testlerinin çalışılması önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: Anti-nükleer antikor, otoimmün hastalık

PP - 092

HBsAg Pozitif Hastalarda Anti-Nükleer Antikor Prevalansı

Yusuf Afşar, Mesut Bulut, Zeynep Dansuk, Ümmü Gül Erdem

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Çeşitli çalışmalarda kronik hepatit B hastalarında, hepatit B virusu (HBV)'nin otoimmün hastalık gelişimini tetiklediği ve dolayısıyla immün kompleks depolanmasında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, HBsAg pozitif hastalarda anti-nükleer antikor (ANA) sıklığının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, hastanemizin immünoloji ve ELISA laboratuvarlarına Temmuz 2013-Şubat 2014 tarihleri arasında gönderilen ve her iki testin de uygulandığı toplam 91 örnek dahil edilmiştir. HBsAg, ticari bir ELISA kiti (Dia.Pro, Diagnostic Bioprobes, İtalya) ile çalışılmıştır. Serum örneklerinde ANA taraması ise, 1/100 dilüsyonda indirekt floresan antikor (IFA) tekniği ile ticari bir kit (IMMCO Diagnostics, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Çalışma sonucunda HBsAg pozitif toplam 91 örneğin 12'sinde (%13) ANA pozitif olarak saptanmıştır. ANA pozitif hastalarda en sık görülen patern granüler patern (%75) olarak bulunmuştur.

Sonuç: Kronik hepatit B hastalarında otoantikörlerin sıklığını araştırılan çalışmalarda, HBV'nun otoantikör oluşumunu indüklediği bildirilmektedir. Antiviral ilaç ve interferon kullanımının da otoantikör oluşumunu artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle, yeni tanı alan hepatit B hastalarına erken dönemde otoantikör bakılması, gelişebilecek otoimmün hastalıkların erken tespiti ve tedavisi açısından yararlı olabilir.

Anahtar sözcükler: Anti-nükleer antikor, HBsAg

PP - 093

Onikomikoz Kliniği Olan Hastalardan Gönderilen Örneklerde Dermatofit Etkenlerinin Değerlendirilmesi

Asiye Altınöz Aytar¹, Zehra Arslanyılmaz², Hülya Albayrak³, İdris Şahin⁴, Fatma Avcıoğlu⁴

¹Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

²Adıyaman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dermatoloji Kliniği, Adıyaman

³Düzce Atatürk Devlet Hastanesi, Dermatoloji Kliniği, Düzce

⁴Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce

Amaç: Yüzeysel mikotik enfeksiyonlar sıklıkla dermatofitler tarafından, bazen de mayalar ve dermatofitik olmayan küfler tarafından oluşturulur. Çalışmamızda, klinik olarak onikomikoz tanısı konulan hastalarda dermatofit etkenlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına onikomikoz kliniği olan hastalardan gönderilen 224 örnek incelemeye alınmıştır. Tüm örneklerden, SDA (Sabouroud Dextroz Agar) ve DTM (Dermatophyte Test Medium) besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Besiyerleri 26°C ve 37°C'de inkübasyona bırakılmış; kültürler haftada 2-3 kez olmak üzere en az dört hafta kontrol edilmiştir. Fungal kolonilerin makroskopik incelenmesinde; koloninin yüzeysel görünümü, üreme hızı ve ürettiği ısı göz önünde bulundurulmuştur. Kolonilerin mikroskopik incelemesinde ise; laktofenol pamuk mavisi ile hazırlanan boyalı preparatlarda hiflerin yapısı, mikro ve makrokonidyum

varlığı araştırılıp, fungal yapıların görünüm özellikleri mikroskopta küçük ve büyük büyütme objektiflerle değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda 224 örneğin 79'unda üreme saptanmamıştır. Üreme olan 145 örneğin 40'ında (%27.6) *Trichophyton* spp. üremesi tespit edilmiş, bunların 29'u *T.rubrum*, 3'ü *T.mentagrophytes*, 5'i *T.soudanense* ve 3'ü *T.magnini* olarak tanımlanmıştır. Örneklerin 11'inde *Candida* spp., 54'ünde *Penicillium* spp, 25'inde *Aspergillus* spp, 5'inde *Chrysosporium* spp., 4'ünde *Alternaria* spp., 3'ünde *Fusarium* spp, 2'sinde *Sporotrichum* spp., 1'inde *Geotrichum* spp., 35'inde ise diğer non-dermatofitik küf mantarı üremiştir (Bir kısım örnekten çoklu mantar izolasyonu yapılmıştır).

Sonuç: Çalışmamızda dermatomikoz etkenleri içinde en sık *T.rubrum* izole edilmiştir. Non-dermatofitik mantarlar nadiren enfeksiyona sebep olsa da, klinik ile birlikte bu etkenlerin de patojen olarak karşımıza çıkabileceği unutulmamalıdır.

Anahtar sözcükler: Dermatofit, onikomikoz

PP - 094

Kan kültüründe Üreyen *Candida* spp. Suşlarının Gerçek-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması

Harun Ağca, Burcu Dalyan Cilo, Gülşah Ece Özmerdiven, Sezcan Sağlam, Beyza Ener

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

Amaç: Mayalar, immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olmakta ve morbidite ve mortalite oranlarını artırmaktadırlar. Kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan mayaların en kısa sürede tanımlanması, hastalığın tedavisi açısından çok önemlidir. Bu çalışmada, kan kültüründe üreyen mayaların gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ile tanımlanması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Uludağ Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan kültür şişelerinden (BACTEC, Beckton Dickinson, ABD) üreme sinyali alınan ve yapılan Gram boyalı mikroskopik incelemede maya görülen 50 adet kan kültürü dahil edilmiştir. Yöntem geliştirilirken öncelikle standart suşlar (*C.albicans* ATCC 10231, *C.glabrata* ATCC 90030, *C.krusei* ATCC 6253, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.dubliniensis* CD36) ile çalışılmış ve erime ısıları tespit edilen bu suşlar pozitif kontrol olarak tüm çalışmalara dahil edilmiştir. Kan kültürü örneklerinden ekstraksiyon Zymo Spor (Zymo Research, ABD) kiti ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler Rt-PCR'da, floresans rezonans enerji transferi teknolojisine göre üretilmiş probalar aracılığıyla tanımlanmıştır. Kan kültürü örnekleri ayrıca Sabouraud dekstoz agar ekilmiş; üretilen kolonilerin tiplendirilmesi için, germ tüp testi, Mısırunu-Tween 80 besiyerinde mikroskopik inceleme ve API-ID32 (Biomerieux, Fransa) testleri kullanılmıştır. Sonuçlar dizi analizi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Kan kültür şişesinde üreme saptanan örneklerin tamamında amplifikasyon saptanmış ve *Candida* cinsi mayalar tanımlanmıştır. *Candida* türleri için elde edilen erime ısıları değerleri tabloda görülmektedir. Sonuçlar, konvansiyonel yöntemlerle ve dizi analizi ile elde edilen sonuçlar ile tamamen uyumludur.

Sonuç: Kan kültüründe üreyen mayaların üretilmesi ve tanımlanması standart uygulamalarla ortalama 3-4 gün sürmektedir. Bu süre yeni geliştirilmiş test ile 4 saate indirilmiş olup hastaların tedavisine önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: Candida, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Tablo. Candida türleri için belirlenen erime ısıları değerleri

	Erime ısıları °C
<i>C.albicans</i>	65.72±0.30
<i>C.tropicalis</i>	61.81±0.10
<i>C.dubliniensis</i>	63.32±0.35
<i>C.krusei</i>	55.00±0.11
<i>C.glabrata</i>	53.70±0.07
<i>C.parapsilosis</i>	61.10±0.24

Rapamisinin *Candida albicans* Salgısal Aspartil Proteinazları Üzerine Etkisi

Merve Erdoğan¹, Ayşe Kalkancı¹, Takashi Sugita²

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
²Meiji Eczacılık Üniversitesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Tokyo

Candida albicans birçok virülans faktörüne sahip olan fırsatçı bir patojendir. Salgısal aspartil proteinaz (Sap) enzim ailesi en önemli virülans faktörlerinden biridir. Rapamisin (sirolimus) organ nakli reddinde ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bağışıklık sistemini baskılayıcı bir ilaçtır. Aslında, daha önce *Candida* enfeksiyonları için antifungal olarak kullanılmaya başlanmış, daha sonra bağışıklık sistemi üzerine etkisi gösterilmiştir.

Bu çalışmada *C. albicans* SC 5314, J₂-36, J₂-88 kökenleri farklı konsantrasyonlarda rapamisine maruz bırakılmış ve rapamisin etkisi sonrasında Sap aktivitesinin nasıl değiştiği araştırılmıştır. Bu amaçla rapamisin *Candida* için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Rapamisine 18, 24 ve 48 saat süre ile maruz bırakılan *Candida* kökenleri SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) yöntemiyle incelenmiştir. Aynı hücrelerde ayrıca SAP genlerinin ifadesindeki değişiklikler ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile kontrol edilmiştir.

Rapamisinin 0.125 µg/ml - 1 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının *Candida* hücreleri için MİK değeri olduğu bulunmuştur. Bu konsantrasyonlarda rapamisin ile karşılaşan hücrelerde SAP üretiminin baskılandığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Proteinler üzerindeki etki, RT-PCR ile de gen ifadesi düzeyinde doğrulanmıştır. Rapamisin ile Sap enzim baskılanmasının, rapamisinin konsantrasyonundan etkilenmediği, ancak inkübasyon süresi ile ilişkili olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Rapamisin, salgısal aspartil proteinaz

Kandidemili Olgularda Eş Zamanlı İki *Candida* Türü Saptanma İnsidansı: Hacettepe Üniversitesi Mikoloji Laboratuvarı, 1999-2013 verileri

Özlem Doğan Ayçık, Dolunay Gülmez, Sevtap Arıkan Akdağlı

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Kandidemi, hem immün sistemi baskılanmış hem de yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören olgularda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Literatürde, kan kültüründe eş zamanlı olarak birden fazla maya türü üremesi olan kandidemilerle ilgili veriler sınırlıdır. Kanda birden fazla *Candida* türünün eş zamanlı varlığı, özellikle türlerden birinin antifungal ilaçlara dirençli olması durumunda klinik açıdan önem taşır. Bu çalışmanın amacı, merkezimizde aynı kan kültüründe birden fazla *Candida* türü üreme sıklığının retrospektif olarak analizidir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, 1999-2013 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve Mikoloji Laboratuvarında değerlendirilerek sonuçlandırılan kan ve kateter kanı kültürleri incelenmiştir. Örnekler için 1999 yılından 2013 Haziran ayına kadar Bactec 9050 (Becton Dickinson, ABD), sonrasında BactAlert 3D (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemleri kullanılmıştır. Tanımlama, konvansiyonel morfolojik inceleme ve ID32C asimilasyon kiti (BioMérieux, Fransa) ile yapılmıştır. Bir örnekte birden fazla *Candida* türü saptanması durumu kaydedilmiştir. Analiz, örnek ve hasta sayısına göre yapılmıştır. Kan kültürü ile birlikte eş zamanlı kateter kanı kültürü olan hastalar ayrıca değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışma süresince 1.635 örnekte (1.111 kan ve 524 kateter kanı) *Candida* saptanmıştır. Bu örneklerin %2.4'ünde (kan: %1.4 ve kateter kanı: %4.4) birden fazla tür üremiştir (Tablo). Üreme saptanan kateter kanı kültürlerinin %63'ünde eş zamanlı kan kültürünün

de de aynı *Candida* türü izole edilmiştir. Analiz hasta sayısına göre yapıldığında, 935 hastanın %3.1'inde iki *Candida* türü gözlenmiştir. **Sonuç:** Çalışmamızın verileri, kandidemili olgularda eş zamanlı üretilen ikinci *Candida* türlerinin içerisinde antifungal direnç yönünden önem taşıyanların da varlığını göstermekte, ikinci türün izolasyonunun tedavi yaklaşımı yönünden önemini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: Kandidemi, çoklu üreme

Tablo. Birden fazla *Candida* türü üreyen kan ve kateter kanı örneklerinden izole edilen tür kombinasyonları

İzole edilen tür kombinasyonu	Kan örneği (n)	Kateter kanı örneği (n)
<i>C. albicans</i> + <i>C. dubliniensis</i> *	6	6
<i>C. albicans</i> + <i>C. Glabrata</i> **	3	4
<i>C. albicans</i> + <i>C. guilliermondii</i>	0	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. kefyr</i>	1	3
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	0	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. lusitaniae</i>	0	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>	2	2
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	0	2
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. glabrata</i>	1	0
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. lusitaniae</i> ***	2	1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. norvegensis/inconspicua</i>	0	1
<i>C. tropicalis</i> + <i>C. krusei</i>	0	1
<i>C. kefyr</i> + <i>C. lusitaniae</i>	1	0
Toplam	16	23

* Bir hastadan 6 kan ve 6 kateter kanı örneğinde üreme.

** İki hastada kan ve kateter kanı örneğinde üreme.

*** Bir hastada kan ve kateter kanı örneğinde üreme.

Pneumocystis jirovecii Tanısında Yeni Bir In-House Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması

Celal Kurtuluş Buruk¹, İlknur Tosun¹, Fuat Tüfekçi¹, Neşe Kaklıkkaya¹, Gülçin Bayramoğlu¹, Ahu Reis², Faruk Aydın¹

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Trabzon

Pneumocystis jirovecii, immün sistemi baskılanmış bireylerde (AIDS hastaları, transplant alıcıları, kemoterapi alanlar) enfeksiyon etkeni olmakla birlikte, bazı kronik akciğer hastalıklarının neden olduğu hafif sayılabilecek immünolojik bozukluğu olan hastalarda da saptanmaktadır. Tanısında mikroskopik inceleme kullanılmaktadır. Bu çalışmada, internal kontrol içeren yeni bir in-house gerçek zamanlı (Rt)-PCR uygulamasının oluşturulması planlanmıştır.

Rt-PCR için hedef olarak *mitochondrial large-subunit* rRNA geni seçilmiştir. Bölgeye ilişkin sekans üzerinden manuel olarak primerler ve prob belirlenmiştir. İnternal kontrol olarak balıkların viral hemorajik septisemi (VHS) virusu seçilmiştir. Chico ve arkadaşları tarafından kullanılan primerler ve prob sipariş edilmiş; hedef probun raportör boyası FAM-BHQ1, internal kontrolün boyası ROX-BHQ2 olarak seçilmiştir. Roche LightCycler 480 cihazı kullanılarak Rt-PCR sonucu pozitif olarak belirlenen hedef ve VHS virus ürünleri *Escherichia coli* JM109 suşuna klonlanmıştır. Klonlama Rt-PCR ile doğrulanmıştır. İnternal kontrol DNA'sı, primerleri ve probu eşik değeri 26-32 siklus arasında olacak şekilde seyreltilerek *P. jirovecii* amplifikasyon karışımına eklenmiştir. *P. jirovecii*'nin klonlanmış ürününün çeşitli sulandırılmaları ve internal kontrol kullanılarak yapılan

denemeler sonucu *P.jirovecii* DNA'sını saptayabilen ve PCR inhibisyonunu sorgulayabilen *in-house* bir yöntem geliştirilmiştir. Bu "master mix"lerle yapılan özgüllük denemelerinde çeşitli bakteri, virus ve mantar suşlarına ait nükleik asitler ve insan DNA'sı negatif olarak bulunmuştur.

Az sayıda istemde bulunulan, verimli olmayan veya ticari olarak bulunmayan moleküler tanı kitleri, laboratuvar tarafından *in-house* olarak tasarlanıp valide edilerek kullanılmaktadır. Bu çalışma sonucunda internal kontrol ve non-enfeksiyöz hedef kontrolleri içeren *P.jirovecii* tanısında kullanılabilir bir moleküler yöntem geliştirilmiştir. Ayrıca, primerler ve probler arasında uyumluluk sağlandığında başka tanı uygulamalarında da kullanılabilir bir internal kontrol geliştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Pneumocystis jirovecii*, *in-house* gerçek zamanlı PCR

PP - 098

Fungal Enfeksiyon Hastalıklarında Dendritik Hücrelerden İfade edilen Toll-Benzeri Reseptör ve Kemokin Reseptörlerinin Rolü

Emine Yeşilyurt, Işıl Fidan, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Candida enfeksiyonlarına karşı immün cevapta nötrofil, makrofaj ve dendritik hücre (DH)'ler ile bu hücrelerin aktive ettiği Th1 hücreler rol oynamaktadır. Bu nedenle, *Candida* enfeksiyonuna karşı doğal ve kazanılmış immünite birlikte görev alır. DH'ler immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynayan profesyonel antijen sunucu hücrelerdir. DH'ler *Candida* türlerine karşı hücrel immün yanıtın oluşmasına katkıda bulunurlar. Bu çalışmada, *Candida* türleri ile uyarılan DH kültürlerinde PCR ve ELISA yöntemleriyle Toll-benzeri reseptör (TLR) ve kemokin reseptörlerinin ifadenmesi ve sekresyonu araştırılarak, *Candida* enfeksiyonlarında DH'lerden ifade edilen bu reseptörlerin rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızdaki enfeksiyon modeli, *in vitro* olarak *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.krusei* ATCC 6258 referans suşları ile uyarılan DH kültürü ile oluşturulmuştur. Ayrıca *Candida* veya sadece DH içeren kuyucuklar da kontrol grubu olarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin ardından hücreler ve üst sıvıdaki TLR ve kemokin düzeyleri ve ifadenmeleri incelenmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre, kontrol grupları ile kıyaslandığında *Candida* türleri DH'lerden yüksek oranda TLR2, TLR4, TLR6 ifadenmesi ve sekresyonuna neden olmaktadır. Kemokin reseptörleri değerlendirildiğinde, *Candida* türleri ile uyarılmış DH'lerde kemokin reseptör ifadenmesi ve sekresyonu özellikle yüksek konsantrasyonlarda *Candida* varlığında artış göstermiştir. Ayrıca *C.albicans*, *C.krusei*'ye oranla TLR sekresyonunda daha belirgin artışa neden olurken, *C.krusei* daha etkin kemokin artışına neden olmuştur.

Sonuç olarak, *Candida* ile DH'lerin etkileşimi sonucu, çeşitli reseptörler aktive olabilir ve *Candida*'ya karşı immün yanıtı yönlendirebilir. Bu nedenle, DH'lerin *Candida* enfeksiyonlarında koruyucu ve tedavi edici ajan olarak kullanılabilmesi mümkündür.

Anahtar sözcükler: *Candida*, Toll-benzeri reseptör

PP - 099

İnvazif Aspergilloz Tanısında PCR'in Yeri

Müge Aslan¹, Yasemin Öz², Filiz Akşit², Meltem Olga Akay³

¹Yozgat Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Yozgat

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Eskişehir

Amaç: Son yıllarda invazif aspergilloz (İA) sıklığı, bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artışa paralel olarak artmakta, önemli mortalite ve morbidite nedeni olmaktadır. Hastaların prognozunda erken tedavinin etkisi bilinmekle birlikte, mikroskobik

inceleme ve kültür gibi yöntemlerin tanıdaki yetersizlikleri nedeniyle, genellikle mümkün olamamaktadır. Bu nedenle İA'un erken tanısına yönelik kültür dışı yöntemleri içeren çalışmalar gündeme gelmiştir. Bu çalışmada, febril nötropenik hematolojik maligniteli hastalarda İA tanısında PCR'in değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, Ocak 2011-Ocak 2012 tarihleri arasında hematolojik malignite nedeniyle hastanemizin Hematoloji Servisi ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde takip edilen İA açısından riskli hastalar EORTC/MSG kriterlerine göre "proven", "probable" ve "possible" İA olarak sınıflandırılmıştır. İA'u düşündürülen klinik bulgusu olmayan hastalar ise kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Hastaların serum örneklerine, ticari ekstraksiyon kiti (Qi-aAmp DNA minikit, Qiagen, ABD) ile DNA izolasyonu sonrasında panfungal primerler kullanılarak amplifikasyon uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

Bulgular: Toplam 99 hastanın 161 febril nötropenik epizodundan 358 hasta serumu elde edilmiş; bunların 12'sinde (%3.35) fungal DNA saptanırken, kontrollere ait 29 serum örneği negatif olarak belirlenmiştir. "Proven" ve "probable" İA olarak tanımlanan 18 epizodun 3'ünde (%16.66), düşük olasılıklı İA grubunda 60 epizodun 4'ünde (%6.6) 500-550 baz çiftlik bölgede bant görülmüş olup, pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda düşük duyarlılık oranları saptanmış olup, amplifikasyon şartları ve PCR reaksiyon karışımında değişiklikler yapılarak yöntem tekrarlandığında da beklenen sonuçlar elde edilememiştir. Bununla birlikte, moleküler testlerde standardizasyonun sağlanması, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek standardize ticari kitlerin geliştirilmesi İA tanısına önemli katkı sağlayacağından, benzer araştırmaların gerekli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: İnvazif aspergilloz, PCR

PP - 100

Diyabetik Bir Hastada *Sarcophaga* spp. Larvalarının Neden Olduğu Kutanoz Miyazis Olgusu

Filiz Demirel Kaya¹, Ömer Orkun², Ayşe Çakmak², Ahmet Çağkan İnkaya³, Sibel Ergüven¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

Miyazis, diptera larvalarının omurgalı canlıların doku ve organlarına yerleşmesi sonucu oluşan paraziter bir enfeksiyondur. Miyazis, tropikal ve subtropikal bölgelerde, özellikle insanların hayvanlarla yakın temas halinde bulunduğu kırsal kesimlerde daha sık görülmektedir. Miyazis tanısı konağın doku ve organlarında larvaların görülmesi ile konur. Tedaviyi planlamak ve koruyucu önlemlerin alınmasında larvaların doğru tiplendirilmesi önem taşır.

Olgumuz, 68 yaşındaki erkek hasta, diyabetik ayak yarası nedeniyle Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Bölümüne başvurmuştur. Yaklaşık 10 yıldır diyabeti olan hasta sağ ayak topuğunda 5 ay önce oluşan ağrısız ve akıntısız yara nedeniyle bir sağlık kuruluşuna başvurmuş ve yaklaşık 3 ay süren antibiyotik tedavisi almıştır. Aldığı tedaviye rağmen yarısında genişleme olması sebebiyle hastanemize başvurmuş ve hastaya piperasilin/tazobaktam tedavisi başlanarak sağ topuğundaki nekrotik dokunun debridmanı planlanmıştır. Yapılan debridman işlemi sırasında nekrotik doku altında iki adet canlı larva görülmüş, bu larvalar parazitoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Larvalar distile su içinde yıkanmış ve %70'lik alkol içine alınmıştır. Larvaların tiplendirmesi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji ve Entomoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Larvalar burada, sefalofaringeal iskelet ve stigma yapılarının morfolojik özelliklerine göre 3. dönem *Sarcophaga* spp. larvası olarak tanımlanmıştır (Resim 1 ve 2).

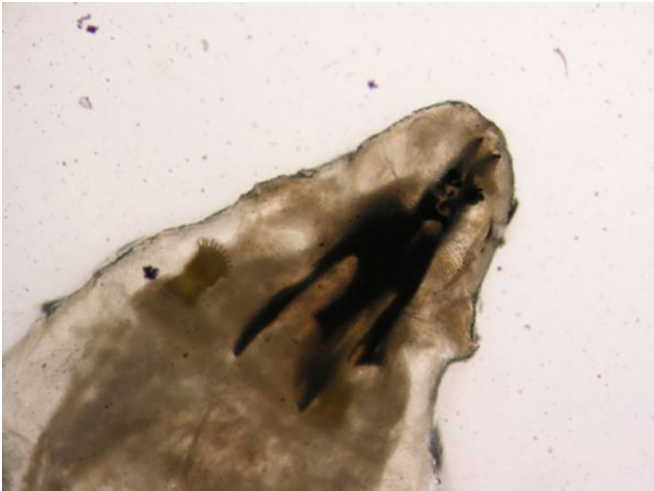
Diyabet, koroner arter hastalığı ve düşük sosyoekonomik seviyenin yanı sıra hastanın ayağında bulunan açık yaranın kapatılmaması ve yeterli bakımının yapılmaması, bu hastada gelişen miyazisin

en önemli predispozan faktörleridir. Bu olguda olduğu gibi ilerleyici yara enfeksiyonu bulunan diyabetik hastalarda özellikle yaz aylarında, bakımsız açık yaraların varlığında miyazis gelişebileceği ve sinek larvalarının da ilerleyici doku yıkımına neden olabileceği akılda tutulmalıdır.

Anahtar sözcükler: Miyazis, *Sarcophaga*



Resim 1. Nekrotik doku altından çıkarılan 3. dönem *Sarcophaga* spp. larvaları



Resim 2. Sefalofaringeal iskelet ve anterior stigma

PP - 101

Şanlıurfa'da Sıtma Parazitlerinin Nested PCR ile Tanımlanması

Nebiye Yentür Doni¹, Adnan Seyrek², Fadile Yıldız Zeyrek³, Reşat Dikme¹, Gülcan Gürses¹

¹Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Şanlıurfa

²Firat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

³Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa

Amaç: GAP nedeniyle sulu tarım şehri haline gelen ve iklim değişikliğinin yaşandığı Şanlıurfa'ya göçer tarım işçisi gelmesinin yanı sıra, bölgeden Türkiye'nin çeşitli illerine tarım işçisi gitmektedir. Komşu ülkelerde de sıtma olguları görülmektedir. Bu da sıtma bulaşına zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle, sıtmanın endemik olduğu Şanlıurfa'da sıtmanın erken, hızlı ve doğru tanısı zorunlu bir işlem haline gelmiştir. Bu çalışmada, sıtma tanısında, nested PCR (nPCR)'in geleneksel mikroskopik tanıya göre geçerliliğinin ve yerinin belirlenmesi, nPCR ile sıtma tespiti ve *Plasmodium* türlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Metodolojik tipteki bu epidemiyolojik araştırma, Şanlıurfa'nın sıtma görülen ilçelerinde (Harran, Siverek ve Akça-

kale) 2008-2011 yıllarında yapılmıştır. Tarımla uğraşan, mevsimlik işçi olarak çalışan ve sıtma şüpheli 153 bireyden parmak ucu kan alınarak Whatman 3M filtre kağıtlarına (Whatman, ABD) emdirilmiş ve havada kurutulmuştur. Ayrıca kalın damla ve ince yayma preparatları hazırlanmıştır. Filtre kağıtlarından ekstrakte edilen DNA ürünleri, Snounou ve arkadaşlarının geliştirdiği *Plasmodium* cins ve türe özgül primerler kullanılarak iki aşamalı nPCR ile analiz edilmiştir. Amplifiye edilen PCR DNA ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş, etidyum bromürde 30 dakika boyandıktan sonra ultraviyole translüminatör ile görüntülenmiştir.

Bulgular: Çalışmaya alınan 153 bireyin 11'inde (%7.2) mikroskopik inceleme ile, 15'inde (%9.8) ise cinse özgül primerlerin kullanıldığı nPCR ile sıtma saptanmıştır. Türe özgül primerlerin kullanıldığı nPCR ile 15 *Plasmodium*'un 14'ü *P.vivax* olarak tanımlanmıştır. Mikroskopik tanıya göre nPCR'in duyarlılığı %100, özgüllüğü %97.2 ve pozitif prediktif değeri %73.3 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Bu veriler ışığında, sıtma tanısında mikroskopik incelemenin yanı sıra nPCR'in kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Plasmodium* türleri, nested PCR

PP - 102

Romatoid Artritli Bir Hastada Toksoplazma Retinit

Funda Doğruman Al¹, Ayşe Caner², Mert Döşkaya², Işıl Fidan¹, Esra Atalay³, Resul Karakuş⁴, A. Yüksel Gürüz²

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir

³Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Ankara

İmmün süpresif tedavi (metotreksat 15-20 mgr/hf) alan romatoid artritli 77 yaşında kadın hasta, 15.01.2014 tarihinde iki ay önce başlayan görmesinde azalma şikayetiyle Gazi Üniversitesi Hastanesi Göz Hastalıkları polikliniğine başvurmuştur. Görme keskinliği 0.4 olarak tespit edilen hastanın yapılan fundus muayenesinde, sağ gözde makulada nekrotizan retinit ve optik disk ödemi, sol gözde ise superonazal retina alanında retinit ve optik disk ödemi saptanmıştır. Hastanın İmmünoloji Laboratuvarında yapılan serolojik tetkiklerinde serum anti-toksoplazma IgM pozitif (1.96 IU/ml), anti-toksoplazma gG pozitif (>200 IU/ml) olarak saptanırken, IgG avidite testinde yüksek avidite indeksi (%63) belirlenmiştir (Architect i1000SR, Abbott Diagnostics, Avustralya). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Moleküler Parazitoloji Laboratuvarında göz içi sıvısına uygulanan DNA ekstraksiyonu sonrası *Toxoplasma gondii*'nin 529 bazcifti büyüklüğünde tekrarlayan gen bölgesi (Gen Bankası no: AF146527) gerçek zamanlı polimeraz zincir yöntemi (PCR) (LightCycler 1.2, Roche, ABD) ile araştırılmış ve toksoplazma DNA'sı saptanmıştır. Hastaya trimetoprim/sülfametoksazol ve azitromisin kombinasyon tedavisi başlanmış olup, tedavi sonrası ikinci ayda yapılan kontrol göz muayenesinde iyileşme sürecinde olduğu (görme keskinliği 0.7) ve kısmi düzelme varlığı gözlenmiştir.

Oküler toksoplazmoz, *T.gondii* protozoonunun neden olduğu, immün sistemi yeterli ve yetmezlikli olgularda hem kazanılmış hem de konjenital enfeksiyonun reaktivasyonu şeklinde görülmektedir. Tanı genellikle göz muayenesine dayanmakta olup, özgün tedaviye yanıtın görülmesi ile doğrulanmakla birlikte, lokal antikor yanıtı, PCR ve Western Blot gibi yöntemler de tanıda kullanılmaktadır. İmmün yetmezlikli olgularda PCR yöntemi serolojik testlere göre daha faydalı olabilmektedir. Bu olguda da muayene bulgularına göre toksoplazma retinitini ön tanısı, serolojik parametreler ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle doğrulanmıştır.

Anahtar sözcükler: Retinit, *Toxoplasma gondii*

PP - 103

Yenidoğanlarda Konjenital CMV Enfeksiyonu Prevalansının Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR İle Araştırılması ve İlişkili Komplikasyonların İzlenmesi

Fatih Şahiner¹, Ferhat Çekmez², Merih Çetinkaya³, Güven Kaya², Tuğçe Kalaycı³, Ömer Güneş², Kenan Şener¹, Mehmet Yapar¹, Turan Tunç², Ayhan Kubar¹

¹Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara

²Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

³Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi Yenidoğan Bölümü, İstanbul

Semptomatik konjenital CMV enfeksiyonlarının büyük bir bölümü primer maternal enfeksiyonları takiben oluşuyor olsa da, son zamanlarda yapılan çalışmalarda immün annelerden doğan ve büyük çoğunluğu asemptomatik CMV enfeksiyonlu olan bebeklerin de uzun dönem sekel riski altında olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışma, canlı doğan infantlarda konjenital CMV enfeksiyonu prevalansını belirlemek için Türkiye'de yapılan ilk sistematik araştırmadır.

Çalışmaya iki ayrı enstitüden toplam 944 yenidoğan dahil edilmiştir. Maternal test sonuçlarına bakılmaksızın tüm yenidoğanların doğum sonrası ilk üç günde tükürük örneklerinde ve tükürük örneğinde pozitiflik saptananların doğum sonrası ilk iki hafta içerisinde alınan idrar ve kan örneklerinde TaqMan temelli tipe özgül gerçek zamanlı PCR ile CMV-DNA varlığı kantitatif olarak araştırılmıştır. CMV-DNA pozitifliği saptanan tüm yenidoğanlar ve annelerinin serolojik durumları iki farklı ticari ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, konjenital CMV enfeksiyonu prevalansı %1.38 (13/944) olarak bulunmuştur. İkiz gebelik oranının %1.94 (18/926) olarak saptandığı çalışmada, ikiz ve tekil gebeliklerde konjenital CMV enfeksiyonu prevalansı sırasıyla %16.7 (3/18) ve %0.77 (7/908) oranlarındadır (P=0.001). Konjenital enfeksiyonlu 13 yenidoğanda doğumda ve doğum sonrası 3 ve 6 aylık kontrollerde semptomatik enfeksiyon bulgusuna rastlanmamıştır. Enfekte bebeklerin sadece %30.8 (4/13)'ünde viremi saptanırken, tüm enfekte bebekler ve annelerinde IgM negatifliği ve yüksek aviditeli IgG pozitifliği (muhtemel rekkürren enfeksiyonlar) tespit edilmiştir.

Türkiye'de konjenital CMV enfeksiyonu prevalansına dair bilgilerimiz genel olarak maternal taramaları (serolojik veya moleküler) temel olarak yapılan araştırmalara veya çoğunlukla semptomatik enfeksiyonların sunulduğu olgu raporu/serilerine dayanmaktadır. Bu çalışma, ülkemizde doğrudan canlı doğan infantlar üzerinde yapılan ve asemptomatik enfeksiyonlara ait prevalans verileri sunan ilk araştırmadır.

Anahtar sözcükler: CMV, konjenital enfeksiyon

PP - 104

Kan Donörlerinde Hepatit Delta Virus (HDV) Enfeksiyonunun Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Berrin Uzun, Aslı Gamze Şener, Serdar Güngör, İlhan Afşar, Mustafa Demirci

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

Amaç: Hepatit B (HBV) ve hepatit delta (HDV) virusları, transfüzyon tıbbinin potansiyel tehlikeli ajanlarından. Bu çalışmada, HBsAg pozitifliği saptanan gönüllü kan donörlerinde serolojik ve moleküler yöntemlerle HDV'nin araştırılarak bölgemizdeki durumun ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma popülasyonu, Nisan 2010 - Şubat 2011 tarihleri arasında başvuran donörlerden oluşturulmuştur. Bağışçıların donör sorgulamaları "Kan ve Kan Ürünleri Rehberi" Donör Sorgulama kriterlerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kan ba-

ğışçısı olarak kabul edilen 12.423 kişinin rutin serolojik tarama testleri AxSYM sistemi (Abbott Laboratories, ABD) ile çalışılmıştır. HBsAg reaktif saptanan örnekler tekrarlayan reaktivite açısından değerlendirilmiştir. Tekrarlayan reaktif sonuç veren 124 numuneyle çalışmaya başlanmış, ancak serum yetersizliği nedeniyle çalışmaya 88 numune dahil edilebilmiştir. HBsAg reaktif 88 örneğin total anti-delta antikorları Alisei sistemi (Radim, İtalya) ile, HDV-RNA tespiti ise kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle (Bosphore HDV quantification kit, Anatolia Geneworks, İstanbul) gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Kan donörleri arasında HBsAg reaktivitesi %1 (124/12.423) olarak saptanmıştır. Çalışmaya alınan 85 donör (%96) erkek, 3 donör (%4) kadındır. Örneklerin %3.4'ünde (3/88) anti-HDV reaktif bulunmuş; bunların da 2'sinde HDV-RNA varlığı saptanmıştır. HDV-RNA pozitifliği, HBsAg reaktif saptanan donörlerin %2.3'ünde (2/88) tespit edilmiştir. HDV-RNA saptanan iki donörün biri 30, diğeri 31 yaşında olan erkek kardeşlerdir. Bu olgularda HDV viral yükü 5.37×10^6 kopya/ml ve 5.10×10^6 kopya/ml olarak bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda donör HDV seroprevalansı Doğu ve Güneydoğu bölgelerimize kıyasla daha düşük bulunmuştur. HDV'nin araştırılması, HBV enfeksiyonları açısından Türkiye gibi orta endemik olan bölgelerde önem taşımakta olup, bu amaçla anti-HDV tespiti güvenli ve ucuz bir tanı yöntemidir. Çalışmamızda ayrıca, aile içi bulaşın HDV için de geçerli ve önemli olduğu vurgulanmıştır.

Anahtar sözcükler: Anti-HDV, HDV-RNA

PP - 105

Türkiye'nin Batısında Hepatit C Virus Genotiplerinin Dağılımı: 4 Yıllık Deneyim

Berrin Uzun, Aslı Gamze Şener, Serdar Güngör, İlhan Afşar

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

Amaç: Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonlarında viral genotip tayini, antiviral tedavinin seçiminde, tedavi süresi ve tedaviye yanıtın takip edilmesinde büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada, İzmir ilinde HCV ile enfekte hastalarda HCV genotiplerinin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Ocak 2010-Aralık 2013 tarihleri arasında hastanemizin Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, anti-HCV (ELISA; Advia Centaur XP, Bayer-Siemens, Almanya) ve HCV-RNA (Real time HCV assay; Abbott Molecular Inc, ABD) pozitif olarak saptanan toplam 308 kronik hepatit C'li hasta (165 kadın, 143 erkek; ortalama yaş: 57.06 ± 13.65 yıl) dahil edilmiştir. HCV genotip tayini, ABI 7000 (Abbott Laboratories, Real-Time HCV Genotype II assay, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

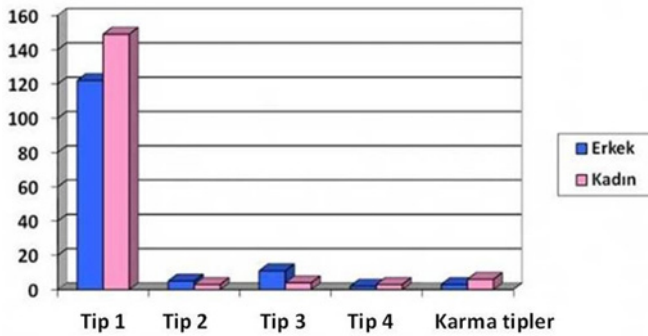
Bulgular: Anti-HCV reaktif saptanan ve kronik hepatit C tanısına sahip toplam 4.327 hastada HCV-RNA çalışılmıştır. Hastaların %29'unda (n: 1.250) viral genom saptanmıştır. Viral genom saptanan ve ardından genotiplendirme istenen 308 hastanın ortalama yaşı 57.06 ± 13.65 , yaş aralığı 20-85 yıldır. Hastaların 271'i (%88) genotip 1; 15'i (%4.9) genotip 3; 9'u (%2.9) karma (mixed) genotip; 8'i (%2.6) genotip 2; 5'i (%1.6) genotip 4 olarak belirlenmiştir. Karma genotiplerin 8'i genotip 1+genotip 4 iken biri genotip 1+genotip 3'dür. Genotiplerin yaş gruplarına göre dağılımı tabloda, cinsiyetlere göre dağılımı ise şekilde gösterilmiştir.

Sonuç: Ülkemizdeki diğer çalışmalara paralel olarak, hastanemize başvuran hepatit C'li hastalarda da en yaygın tipin genotip 1 olduğu, genotip 3 ve genotip 4'ün İzmir ve Türkiye ortalamalarının biraz üzerinde prevalansa sahip olduğu belirlenmiştir. Genotip 1 ve 4'ün ilaç direnci ve tedavi cevabı düşünüldüğünde, hastalarımızın %92.2'sinin dirençli tiplerle enfekte olduğu ve bölgemizdeki HCV hastalarının tedavi başarısızlığı gibi ciddi bir sorunla karşı karşıya olduğu ifade edilebilir.

Anahtar sözcükler: HCV-RNA, genotiplendirme

Tablo. HCV genotiplerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş grubu	Genotip 1	Genotip 2	Genotip 3	Genotip 4	Karma Genotip	Toplam
20-29	10	1	2	-	-	13
30-39	20	2	3	-	1	26
40-49	27	3	8	-	-	38
50-59	68	2	2	2	3	77
60-69	99	-	-	1	3	103
≥70	47	-	-	2	2	51
Toplam	271	8	15	5	9	308

**Şekil. HCV genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı****PP - 106**

2013-2014 Kış Sezonunda Solunum Yolu Enfeksiyonu Düşünülen Hastalarda Viral Etkenlerin Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması

Aydan Karaçül, Meral Akarca, Koray Ergünay, Ahmet Pınar

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Solunum yolu enfeksiyonları tüm dünyada enfeksiyonla ilişkili morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir. Bu enfeksiyonların büyük bölümü, solunum sinsiyal virusu (RSV), influenza virusları, parainfluenza virusları (PIV), koronavirüsler (CoV) ve rinovirüsler (RV) gibi etkenler tarafından oluşturulmaktadır. Viral solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında, çok sayıda etkenin daha düşük maliyetlerle ve hızlı bir şekilde tespitine imkan sağlayan multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (M-PCR) testleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, Hacettepe Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarında Ekim 2013 - Nisan 2014 tarihleri arasında incelenen 164 nazofarengeal sürüntü örneğinde solunum yolu hastalığı etkeni virüsler incelenmiştir. Örneklerde etkenlerinin saptanmasında enfeksiyon etkeni olabilen 15 farklı virüsü eşzamanlı ve kalitatif olarak tespit eden ticari bir M-PCR yöntemi (Seplex RV 15 ACE detection kit, Seegene, South Korea) kullanılmıştır.

Çalışmada değerlendirilen toplam 164 örneğin 92'sinde (%56) virüs pozitifliği saptanmıştır. Toplam 71 örnekte tek viral ajan saptanırken, 19 olguda 2 ve 2 olguda 3 viral ajan eş zamanlı olarak tespit edilmiştir. Örneklerin 33'ünde influenza virusu tip A, 23'ünde RSV grup A, 20'sinde RV, 13'ünde PIV-3, 5'inde CoV 229/NL63, 4'ünde PIV-2, 3'ünde bokavirus, 3'ünde influenza virusu tip B, 3'ünde RSV grup B, 2'sinde PIV-4, 2'sinde CoV OC43, 2'sinde adenovirus, 1'inde enterovirus ve 1'inde PIV-1 saptanmıştır.

Sonuç olarak, incelenen sürede dolaşımdaki virüslerin büyük çoğunluğunun, influenza virusu tip A (%20), RSV grup A (%14) ve RV

(%12) olduğu tespit edilmiştir; en sık koenfeksiyonlar RV ile RSV-A arasında görülmüştür. M-PCR temelli testlerin viral solunum yolu enfeksiyonlarının hızlı tanısında faydalı olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Influenza A virusu, solunum yolu virüsleri

PP - 107

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Tanısında Örnek Saklama Koşullarının Moleküler Testler Üzerine Etkisi

Dilek Menemenlioğlu, Dilek Yağcı Çağlayık, Gülay Korukluoğlu, İhsan Durmaz, Nilgün Gökcalp

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Viroloji Referans Laboratuvarı, Ankara

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı PCR'nin keşifleri tanısal viroloji alanında çığır açmıştır. Moleküler testler, virolojide hızlı, duyarlı ve özgül tanıyı sağlayabilmektedir. Örneğin alınması, transportu, saklanması, nükleik asit ekstraksiyonu ve saklanması moleküler testlerde kesin, doğru ve tekrarlanabilir sonuç elde edilmesinde önem taşımaktadır. Kırım Kongo kanamalı ateşi (KKKA), geniş ve artan coğrafi yayılımı, toplum ve hastanede oluşturduğu salgınlar, yüksek fatalite hızı gibi nedenler ile hızlı ve güvenilir tanı gerektirmektedir. *Bunyaviridae* ailesi, *Nairovirus* cinsinde yer alan KKKA virusu, 3 segmentli, tek sarmallı negatif anlamlı RNA virusudur. Tanı, erken viremik dönemde ters transkriptaz gerçek zamanlı PCR (rRT-PCR) ile viral genomun saptanması ve 7. günden sonra IgM yanıtının gösterilmesi ile konmaktadır.

Bu çalışmada, Ulusal Arbovirus ve Viral Zoonotik Hastalıklar Ünitesi laboratuvarında tanı amaçlı kullanılmakta olan rRT-PCR reaksiyonu üzerinde, örneklerin ve ekstraksiyon ürünlerinin saklama koşullarının etkisi araştırılmıştır. Toplam 16 pozitif hasta serumu ile çalışma planlanmıştır. Porsiyonlanarak +4°C ve -20°C'de 3 gün bekletilmiş serum örneklerinden ekstraksiyon gerçekleştirilmiş, iki gruptan 3'er farklı örnekte uyumsuzluk saptanmıştır. Her iki gruba ait toplam 32 ekstraksiyon ürünü de rRT-PCR sonrasında porsiyonlanarak +4°C ve -20°C'de bekletilmiş ve üçüncü, yedinci ve onikinci günlerde rRT-PCR çalışılmıştır. Bekletilmiş ekstraksiyon ürünlerinden gerçekleştirilen toplam 192 reaksiyonun biri haricinde sonuçların uyumlu olması +4°C veya -20°C'de 12 güne kadar ekstraksiyon ürünlerinin güvenle saklanabileceğini düşündürmektedir. Uyumsuz olan sonuç değerlendirildiğinde, bu örnekle gerçekleştirilen toplam 12 rRT-PCR reaksiyonunun birinde pozitiflik gözlenmesi, içerdiği RNA miktarının, kullanılan test için saptama sınırına yakın olması ile açıklanabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Moleküler testler, saklama koşulları

PP - 108

Dört Yıllık HSV-DNA PCR Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Rabia Can Sarınoğlu¹, İmran Sağlık¹, Derya Mutlu¹, Betül Özhan Baysan¹, Dilara Öğünç¹, Özgür Duman², Dilek Çolak¹¹Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya²Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümüne Herpes simplex virusu tip 1 ve 2 (HSV 1-2) DNA varlığının araştırılması için gönderilen çeşitli klinik örnekler için sonuçların retrospektif olarak değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 2010-2013 yılları arasında gönderilen 643 hastadan alınan 1.341 BOS, 25 plazma ve 11 cilt-mukoza sürüntü örneği dahil edilmiştir. Tüm örneklerde nükleik asit ekstraksiyonu (EZ1 Virus Mini Kit, Qiagen, Almanya) yapıldıktan sonra gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) (Qiagen Artus

HSV-1/2 RG PCR, Almanya) ile HSV-1/2 DNA varlığı üretici firma önerileri doğrultusunda araştırılmıştır.

Bulgular: Hastaların yaş ortanca değeri 15 (aralık: 0-91) yıldır. Örneklerin %54'ü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümünden, %31.4'ü İç Hastalıkları Bölümünden, %8.4'ü Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümünden, %2.3'ü Anesteziyoloji ve Reanimasyon Bölümünden ve %3.9'u diğer bölümlerden gönderilmiştir. Toplam 1.377 örneğin 12'sinde (%0.9) PCR inhibitörü saptanmış ve bu örnekler çalışmaya alınmamıştır. Çalışmamızda, 12 (%0.9) BOS ve 6 (%54.5) cilt-mukoza sürüntü örneğinde HSV-1 DNA'sı, 2 (%0.1) BOS örneğinde ise HSV-2 DNA'sı saptanmıştır. Toplamda örneklerin %1.5'inde pozitiflik tespit edilmiştir. Pozitiflik saptanan 20 örnek 18 hastaya (11'i çocuk, 7'si erişkin) aittir. Pozitiflik saptanan 14 BOS örneğinin hiçbirinin direkt mikroskopik incelemesinde hücre ve mikroorganizma görülmemiş, bakteri kültüründe üreme olmamıştır. Cilt-mukoza sürüntü örneklerinde HSV-1 DNA pozitif saptanan 4 hastadan 3'ü immün sistemi baskılanmış (kök hücre nakli, lenfoma, yüz nakli) hastalardır.

Sonuç: Laboratuvarımızda en sık BOS (%97.4) örneklerinde HSV-1/2 DNA'sının araştırılmış olduğu belirlenmiştir. En çok klinik örneğin ise Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümünden gönderilmiş olduğu anlaşılmıştır. HSV-1/2 enfeksiyonları tanısında PCR ile HSV-DNA araştırılmasının etkili ve hızlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Herpes simplex virus, PCR

PP - 109

Hematoloji-Onkoloji Hastalarında İki Farklı Ticari Kit ile Eş Zamanlı Olarak CMV DNA'nın Araştırılması

Hüseyin Kılıç¹, Ömür Mustafa Parkan¹, Leylagül Kaynar², Gökhan Metan³, Mustafa Altay Atalay¹, Muzaffer Keklik², Ferhan Elmalı⁴, Selma Gökahmetoğlu¹

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

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri

⁴Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Kayseri

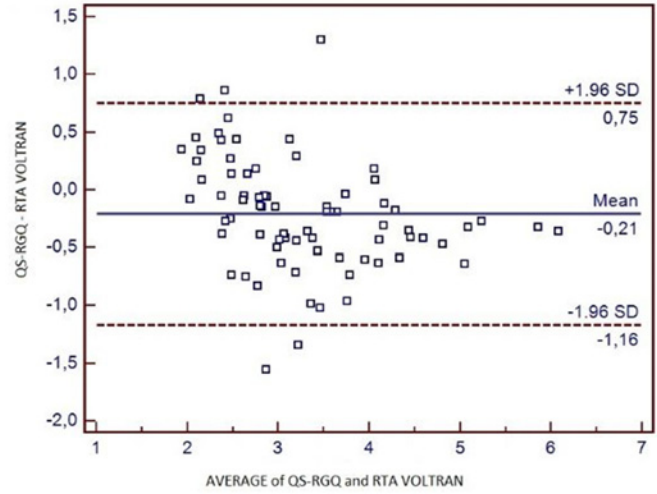
Amaç: Cytomegalovirus (CMV) DNA kantitatif viral nükleik asit testleri, özellikle immün süpresif hastalarda CMV enfeksiyonun tanı ve tedavisini yönlendirmektedir. Bu çalışmada CMV DNA saptanmasında iki farklı gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) yöntemi eş zamanlı olarak çalışılarak sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Şubat 2014-Mart 2014 arasında CMV DNA tayini için gönderilen 605 adet EDTA'lı kan örneği QIASymphony RGQ (QS-RGQ) sistemi (Qiagen, Almanya) ve RTA VOLTRAN sistemi (RTA Laboratuvarları, Türkiye) ile aynı anda çalışılmıştır. CMV QS-RGQ sistemi kitinin ölçüm aralığı 80-100.000.000 kopya/ml olup, analitik hassasiyeti 42 kopya/ml'dir. RTA CMV Rt-PCR kitinin ölçüm aralığı ise 55-920.000.000 kopya/ml ve analitik hassasiyeti 55 kopya/ml'dir. Her iki sistem ile elde edilen sonuçların uyumu ve korelasyonu istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

Bulgular: Test edilen 605 örneğin 352'si her iki sistemle de CMV DNA açısından negatif bulunurken, QS-RGQ sistemi ile pozitif bulunan 8 ve düşük pozitif (<80 kopya/ml) bulunan 142 adet örnek RTA VOLTRAN sistemi ile negatif bulunmuştur. QS-RGQ sistemi ile negatif bulunan 3 örnek ise RTA VOLTRAN sistemi ile düşük pozitif (<55 kopya/ml) olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre iki testin istatistiksel açıdan orta derecede bir uyuma sahip olduğu bulunmuştur (kappa katsayısı=0.436, p<0.001). İki sistemin dinamik aralığı içerisinde elde edilen 75 kantitatif sonuç Spearman korelasyon testi ile değerlendirildiğinde, sistemler arasında iyi bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (r=0.880, p<0.001). Bland-Altman yöntemi ile değerlendirildiğinde ise ölçülen viral yükler arasında RTA VOLTRAN sistemi lehine ortalama 0.21 log₁₀ kopya/ml'lik bir fark olduğu görülmüştür (Şekil).

Sonuç: İki sistemin karşılaştırılması sonucunda tespit edilen farklılıkların, klinik açıdan yansımalarının değerlendirilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: CMV, gerçek zamanlı PCR



Şekil. CMV DNA tespitinde QS-RGQ ve RTA VOLTRAN testlerinin Bland-Altman yöntemi ile karşılaştırılması

PP - 110

Viral Solunum Yolu Hastalıklarında Etkenlerin Mikroarray Bazlı Moleküler Yöntemle Belirlenmesi

Oya Akkaya, Hülya İren Güvenç, Şerife Yüksekaya, Ayşegül Opuş, Asuman Güzelant, Meral Kaya, Muhammed Güzel Kurtoğlu

Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Konya

Amaç: Viral alt solunum yolu enfeksiyonları ve komplikasyonları, çocukluk çağının en önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasındadır. Son yıllarda, nükleik asit tabanlı tekniklerin gelişmesiyle solunum yolu enfeksiyonlarının çoğunun virüsler tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir. Yaşamın ilk yılında oluşan pnömonilerin %90'ı viral kaynaklı iken, okul çağında bu oran %50'ye düşmektedir. Bu çalışmanın amacı, alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı konulan, yatan veya ayaktan hizmet alan hastalarda, etken olan virüslerin multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (M-PCR) yöntemiyle belirlenmesi ve viral alt solunum yolu oranlarının ortaya konmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Ekim 2013-Nisan 2014 tarihleri arasında, laboratuvarımıza akut bronşit, bronşiolit ve pnömoni ön tanısıyla gönderilen 290 çocuk hastanın nazofarengeal sürüntü örneği dahil edilmiştir. Hastalardan alınan nazofarengeal sürüntü örneklerinde, mikroarray bazlı M-PCR yöntemiyle (CLART® PneumoVir, Genomica, İspanya) solunum yolu virüslerinin varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, 290 örneğin 177'sinde (%61) virus varlığı tespit edilmiştir. Pozitif örneklerde RSV %31'lik (n: 55) oranla ilk sırada yer alırken, onu influenza %13 (n: 23) ve rinovirus %12 (n: 22) izlemiştir. Bokavirus %6, parainfluenza virüsler %6, adenovirus %5, metapnömovirus %3 ve koronavirus %1 oranında saptanmıştır. Çalışmada 32 (%18) hastada iki virus aynı anda, 10 hastada ise (%6) üç virus aynı anda tespit edilmiştir.

Sonuç: Çocuk hastalarda alt solunum yolu enfeksiyonlarında en sık etken %31'lik oranla RSV olarak belirlenirken, influenza %13 ile ikinci sırada, rinovirus ise %12 ile üçüncü sırada yer almıştır. İnsan metapnömovirusu ve bokavirus gibi yeni tanımlanan etkenlerin de etyolojide önemli yer tuttuğu gösterilmiştir. Sonuç olarak mikroarray bazlı M-PCR yönteminin, viral solunum yolu enfeksiyonlarının tanısı için kolay, hızlı ve güvenli testler olduğu ve bu testlerin, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin tanı testleri arasında yer alması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Solunum virüsleri, multipleks PCR

HIV Enfeksiyonu Tanısında Enzim Immunoassay (EIA), Immunoblot ve HIV RNA PCR Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İmran Sağlık¹, Rabia Can Sarınoğlu¹, Aylin Daloğlu Erman¹, Gözde Öngüt¹, Derya Mutlu¹, Dilara İnan², Dilek Çolak¹

¹Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

²Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Amaç: Bu çalışmada, insan immün yetmezlik virusu (HIV) enfeksiyonunun tanısında HIV antikor (Ab) ve antijenini (Ag) saptayan bir EIA testi ile HIV RNA ve HIV immunoblot (IB) test sonuçlarının retrospektif olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Bölümünde, 2010-2013 yılları arasında HIV 1-2 Ab+Ag EIA, kantitatif HIV RNA PCR ve HIV 1-2 Ab IB testleri çalışılan 208 hastanın 213 kan örneğine ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Serum örneklerinde HIV 1-2 Ab+Ag tayini elektrokemilüminesans EIA yöntemi (Elecys HIV combi PT test, Roche Diagnostics, Almanya) ile yapılmış, HIV 1-2 antikorları IB yöntemi (INNO-LIA HIV I/II Score, Innogenetics, Belçika) ile araştırılmıştır. HIV RNA varlığı 117 plazma örneğinde gerçek zamanlı PCR yöntemi (Ampliprep/COBAS Tagman HIV-1 Test, Roche Diagnostics, Almanya) ile otomatize olarak çalışılmıştır.

Bulgular: Hastaların yaş ortalaması 37.4±14.9 yıl olarak hesaplanmıştır. HIV EIA yöntemi ile 213 serum örneğinin 122'si (%57.3) pozitif, 85'i (%39.9) negatif, 6'sı (%2.8) sınır değer (greyzon) olarak saptanmıştır. Pozitif örneklerin 38'inde HIV IB testi ve HIV RNA PCR testi pozitif (ortanca: 178500 k/mL aralık: 260-1000000) bulunmuştur. HIV EIA yöntemi ile pozitif bulunan 80 örneğin IB testi negatif, 4 örneğin ise sınır değer olarak saptanmıştır (Tablo). HIV IB sonucu sınırdan saptanan bu 4 hastanın takibinde HIV enfeksiyonu gösterilememiştir. EIA testi negatif olup HIV IB veya HIV RNA PCR testi pozitif olan hastaya rastlanmamıştır. EIA testi pozitif (COI: 9.5), HIV IB testi negatif saptanan bir hastanın HIV RNA PCR'ı pozitif (187000 k/ml) bulunmuştur. Bu hastanın son bir ay içinde riskli temasının olduğu öğrenilmiş ve takibinde HIV enfeksiyonu varlığı kanıtlanmıştır.

Sonuç: HIV enfeksiyonu tanısında HIV EIA pozitif sonuçların farklı yöntemle çalışan testlerle doğrulanması gerekmektedir. HIV IB testi HIV 1 ve 2 antikorlarının ayırımını yapmakta ve HIV EIA pozitifliklerinde yol gösterici olmaktadır. Ancak erken dönem HIV enfeksiyonunun tanısında PCR ile HIV RNA'nın aranması duyarlılığı artırır.

Anahtar sözcükler: HIV, immunoblot, EIA

Tablo. HIV EIA pozitif test sonuçlarının ortanca ve aralık COI (OD value of sample/Cut-off value) değerleri

Immunoblot	EIA Pozitif		
	Sayı (%)	Ortanca (COI)	Aralık (COI)
Pozitif	38 (31.1)	395.2	29.7-1428.0
Sınırdan (greyzon)	4 (3.3)	3.5	1.4-11.5
Negatif	80 (65.6)	1.7	1.0-23.8
Toplam	122 (100)	3.5	1.0-1428.0

Türkiye'de Enfeksiyöz Bronşitis Viruslarının Moleküler Karakterizasyonu

Elif Macide Aral, Barış Sarreyüpoğlu, Mehmet Akan

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Enfeksiyöz bronşitis virusu (*Avian Infectious Bronchitis Virus*; IBV), etçi, yumurtacı ve damızlık tavuklarda solunum sistemi enfeksiyonları, yumurta veriminde azalma, yumurta kalitesinde bozulma ve böbrek hasarıyla ilişkili ölümlere dayalı önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Hastalığın yaygın olduğu bölgelerde koruma, sürü takibi ve aşılama ile sağlanmaktadır. Ancak, farklı coğrafik bölgelerde farklı antijenik karakterde virusların varlığı hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinde yer alan işletmelerde solunum sistemi bulguları görülen tavuk sürülerinde RT-PCR ile saptanan IBV suşlarının S1 geni dizilendirilmesine dayalı karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Teşhis Laboratuvarına gönderilen materyallerden (trakea, akciğerler, vb.), guanidinyum tiosiyanat-fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi ile izole edilen RNA'lar spike protein geninin S1 bölgesine özgül primer çiftlerinin kullanıldığı nested-RT-PCR tekniği ile IBV yönünden araştırılmıştır. İncelenen 200 doku örneğinden 34'ünde (%17) IBV RNA'sı saptanmıştır. Dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu yöntemiyle dizilendirilen 21 örneğin sonuçları GenBank veritabanında BLAST taraması ile incelenmiştir. Örneklerin bir kısmının Türkiye'de kullanılmakta olan aşı suşları olduğu görülürken, diğer kısmının farklı ülkelere ait saha izolatları ve varyantlarla ilişkili suşlar olduğu belirlenmiştir.

IBV suşlarının RT-PCR ile saptanması ve S1 geninin dizi analizine dayanan bu tekniğin, ülkemizde tavuklarda görülen enfeksiyöz bronşitis hastalığının hızlı ve doğru tanısı dışında, IB moleküler epidemiolojisinin ortaya konmasıyla hastalıktan korunma stratejilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Infectious bronchitis virus*, S1 geni

Renal Transplant Alıcılarında Görülen CMV Enfeksiyonlarının Serolojik ve Moleküler Tanısı

Muharrem Çiçek¹, Barış Boral¹, Yusuf Ziya Şener², Aman Abudalal³, Ahmet Çağkan İnkaya⁴, Yunus Erdem³, Alpaslan Alp¹, Burçin Şener¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı, Ankara

⁴Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Sitomegalovirus (CMV), renal transplant alıcılarında enfeksiyona ve takiben greft kaybı ve mortaliteye yol açan önemli etkenlerden biridir. Bu retrospektif çalışmada, 2000-2012 yılları arasında CMV enfeksiyonu nedeniyle merkezimizde tedavi alan renal transplant hastalarının, klinik durumları, serolojik verileri, viral yükleri ve tedaviye yanıtları açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Değerlendirmeye CMV ile enfekte olan 37 renal transplant hastası alınmıştır. Hastaların CMV IgM, IgG ve IgG avidite testleri VIDAS (bioMérieux, Fransa) yöntemi ile çalışılmıştır. İdrar ve serum örneklerinde kantitatif CMV-DNA tespiti farklı dönemlerde Cobas Amplicor (Roche), Tagman (Roche) ve Rotorgene (Qiagen) ile yapılmıştır.

Bulgular: Böbrek naklinden sonra CMV enfeksiyonu izlenen 37 olgunun 9'unda (%24.32) enfeksiyon 0-3 ayda, 10'unda (%27.03) 4-6 ayda ve 18'inde (%48.65) 6 aydan daha uzun sürede gelişmiştir. CMV enfeksiyonu, olguların 20'sinde pnömoni, 10'unda nefrit, 3'ünde kolit, 2'sinde nedeni bilinmeyen ateş, birinde ise ventrikülit olarak izlenmiştir. Hastaların 19'unda tanı sürecinde serolojik

yöntemler kullanılmış; 6 hastada CMV IgM pozitif, 13 hastada ise negatif olarak saptanmıştır. CMV viral yük tayini 6 hastada hem idrar hem serumda, 28 hastada ise sadece serumda gerçekleştirilmiştir. Sitopatolojik inceleme ile de 3 hastaya CMV tanısı konmuştur. CMV viral yükü, 34 hastanın 18'inde yüksek (>4000 kopya/mL), 16'sında ise düşük olarak saptanmıştır. CMV IgM pozitif saptanan 6 hastanın 4'ünde viral yükün yüksek olduğu görülmüştür. Tüm hastalara yaklaşık 3 hafta gansiklovir tedavisi verilmiştir. Kaybedilen 4 hasta dışındaki hastalarda, tedavi sonucunda viral yük negatif olarak saptanırken, 4 hastada relaps görülmüştür.

Sonuç: Transplant olgularında gelişen akut CMV enfeksiyonlarının tanısında CMV IgM düşük duyarlılığa sahip olduğundan serolojik yöntemlerin tanı değeri tartışmalıdır. CMV enfeksiyonunun hızlı tanısı ve antiviral tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde CMV viral yükünün belirlenmesi önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Renal transplant, sitomegalovirus

PP - 114

Doğum Eylemindeki Gebelerde İnsan Sitomegalovirus Enfeksiyonları ve İdrarda CMV Atılımı: Gerçek Zamanlı PCR İle Kantitatif Analiz

Fatih Şahiner¹, Mehtap Honca², Yasemin Çekmez³, Ayhan Kubar¹, Tevfik Honca⁴, Muzaffer Kürşat Fidancı⁵, Tarık Purtuloğlu⁶, Mehmet Yapar¹

¹Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara

²Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, Ankara

³Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul

⁴Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

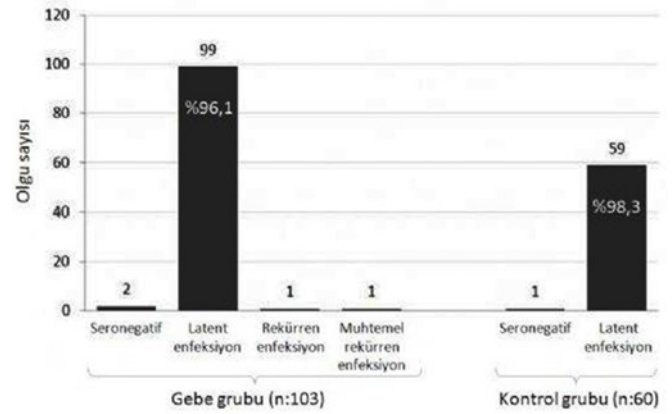
⁵Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

⁶Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Ankara

Konjenital CMV enfeksiyonu çocuklarda merkezi sinir sistemi hastalığı ve işitme kaybının en önemli enfeksiyöz nedenidir. Bu çalışmaya, 103'ü doğum eylemindeki gebe ve 60'ı doğurganlık çağındaki gebe olmayan sağlıklı kadın (kontrol grubu) olmak üzere toplam 163 kişi dahil edilmiştir. Gebe ve kontrol gruplarında CMV IgG seropozitifliği sırasıyla %98.1 (101/103) ve %98.3 (59/60) olarak bulunmuştur (Şekil). Her iki grupta yer alan IgG pozitif kadınların tümünde yüksek aviditeli IgG varlığı saptanmış ve primer enfeksiyon için risk altındaki kadınların oranı <%2.0 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda primer maternal enfeksiyon saptanmazken, gebelerin %1.94'ünde (2/103) muhtemel rekürren enfeksiyon varlığı tanımlanmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizleri ile gebe ve kontrol grubu kadınlarda idrarda CMV atılımı sırasıyla %4.85 (5/103) ve %3.33 (2/60) olarak bulunmuştur. Gebelerin %1.94'ünün (2/103) kan örneklerinde CMV-DNA varlığı saptanırken, kontrol grubunda saptanmamıştır. Gebe ve kontrol grubu arasında idrarda CMV atılımı ve kan örneklerinde CMV varlığı yönünden anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (sırasıyla; p=1.000 ve p=0.532). Çalışmamızda 104 (bir ikiz gebelik) yenidoğanın hiçbirisinde semptomatik konjenital enfeksiyon bulgusuna rastlanmamıştır.

CMV seropozitifliği, semptomatik enfeksiyon gelişimini azaltsa da, immün annelerden doğan asemptomatik bebeklerin de uzun dönem kalıcı sekel gelişmesi için risk altında olduğu bildirilmektedir. Yüksek seroprevalansa sahip toplumlarda maternal testlere dayalı tarama yaklaşımlarının sadece primer enfeksiyon riski altındaki çok küçük bir grup için (çalışmamız verilerine göre <%2.0) yararlı olacağı açıktır. Çalışmamızda, yenidoğanlarda asemptomatik CMV enfeksiyonu varlığı araştırılmadığı ve mevcut veriler kısıtlı olduğu için, konjenital CMV enfeksiyonlarının ülkemizdeki gerçek insidansının ve uzun dönem toplumsal etkilerinin ancak kapsamlı yenidoğan çalışmaları ile belirlenebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: CMV, gebelik



Şekil. Çalışmaya alınan gebe ve kontrol gruplarının CMV serolojik profilleri

PP - 115

Solid Organ Nakli Alıcılarında CMV Antijenemi ve CMV-DNA PCR Verilerinin Karşılaştırılması

Emre Özkarataş¹, Özgen Alpay Özbek¹, Vildan Avkan Oğuz², Ayça Arzu Sayiner¹

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Giriş: Sitomegalovirus (CMV), solid organ nakli alıcılarında en sık karşılaşılan viral etkindir. CMV tanı testlerinin yaygın kullanımına karşın, sonuçların yorumlanmasında, özellikle düşük viral yükün klinik anlamı konusunda fikir birliği bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarında 2011-2013 yılları arasında solid organ nakli alıcılarında (karaciğer ve böbrek) pp65 antijenemi testi ve plazmada CMV-DNA gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemiyle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve iki yöntem arasındaki korelasyon değerlendirilerek, antijenemi pozitifliğine denk gelen viral yük düzeyi belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, pp65 antijenemi ve CMV-DNA qPCR testi birlikte çalışılmış olan örnekler retrospektif olarak incelenmiştir. Aynı hastaya ait antijenemi ile CMV-DNA qPCR testi arasında 48 saate kadar süre olan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. Analizler için SPSS yazılımı v15.0 kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, 100 alıcıya ait 217 örneğin sonuçları değerlendirilmiştir. Örneklerin pp65 antijenemi ve CMV-DNA qPCR sonuçlarının dağılımı tabloda gösterilmektedir. Antijenemi negatif/PCR pozitif 27 örnek bulunurken, antijenemi pozitif/PCR negatif örnek yoktur. Her iki test ile pozitif saptanan örnekler arasındaki korelasyon anlamlı bulunmuştur (r=0.785). ROC analizi ile antijenemi pozitifliğine (>=1 pozitif hücre/200,000 hücre) karşılık gelen CMV-DNA düzeyi %91.9 duyarlılık ve %89.4 özgüllükle, 205 kopya/ml olarak bulunmuştur.

Sonuç: PCR pozitif, antijenemi negatif bulunan örnekler qPCR yönteminin antijenemiye göre daha duyarlı olması ile açıklanabilir. Antijenemi pozitif/PCR negatif örneğin olmaması bu durumu desteklemektedir. ROC analizi, 205 kopya/ml altındaki qPCR pozitifliklerinin büyük olasılıkla antijenemi negatif olarak kabul edilebileceğini göstermiştir. Bu eşik değer, incelenen hasta grubu ve kullanılan testler için geçerlidir.

Anahtar sözcükler: CMV antijenemi, CMV-DNA

Tablo. Örneklerin pp65 antijenemi ve CMV-DNA qPCR sonuçlarının dağılımı

	pp65		Toplam, n (%)
	Pozitif, n (%)	Negatif, n (%)	
CMV-DNA	Pozitif	35 (16.1)	62 (28.6)
	<80 kopya/ml	2 (0.9)	51 (23.5)
	Negatif	0	102 (47.0)
Toplam		37 (17.0)	180 (83.0)
			217 (100.0)

Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Tonsil Dokularında Çeşitli Viral Etkenlerin Saptanması

Fatih Şahiner¹, Ramazan Gümrak², Abdullah Durmaz³, Mustafa Alparslan Babayigit⁴, Üzeyir Yıldızoğlu³, Nuri Yiğit⁵, Mehmet Ali Saraçlı², Ayhan Kubar¹

¹Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara

²Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

³Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

⁴Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Halk Sağlığı ve Epidemiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

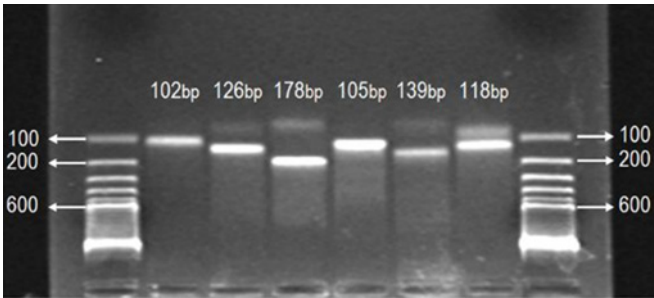
⁵Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tonsillerde görülen ve antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen kronik ve/veya tekrarlayan enfeksiyonlar ve hipertrofik değişiklikler ile viral enfeksiyonlar arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, söz konusu klinik tablolarla ilişkili veya muhtemel ilişkili olduğu bildirilen altı farklı virusun varlığının araştırılmasıdır.

Çalışmaya toplam 56 hastaya (44 çocuk ve 12 erişkin) ait ekzizyonel doku örneği dahil edilmiştir. Örneklerde, virüslere ait nükleik asit varlığı ve düzeyi TaqMan-bazlı kantitatif gerçek zamanlı PCR ile araştırılmıştır (Şekil). Örneklerin %67.9'unda (38/56) en az bir virus varlığı belirlenmiştir. Sıklık sırasına göre; örneklerin 30'unda (%53.6) EBV, 12'sinde (%21.4) B19 virus, 7'sinde (%12.5) adenovirus, 3'ünde (%5.4) CMV, 2'inde (%1.8) BK virus ve 1'inde (%1.8) HSV-1/2 varlığı saptanmıştır. Hastaların hiçbirisinde prekanseröz veya kanseröz lezyon saptanmazken, 24 hastada lenfoid hiperplazi varlığı izlenmiştir. Diğer virüslerin aksine olarak, tonsil dokularında çok yüksek kopya sayılı B19 virus varlığı tespit edilmiştir. EBV ve B19 virus varlığı erişkinlerde daha yüksek oranlarda saptanırken, yüksek kopya sayılı (> 500.000 kopya/ml) EBV ve B19 virus varlığı çocuklarda yetişkinlere oranla daha yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca, EBV varlığı ve yüksek kopya sayılı B19 virus varlığı arasında pozitif ilişki olduğu görülmüştür (p=0.037).

İleri çalışmalarla doğrulanması gereken bu veriler, EBV enfeksiyonlarının B19 virus enfeksiyonları ile ilişkili olabileceğine veya B19 virus replikasyonunu kolaylaştırabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak, kantitatif analizlerin, virüslerin tekrarlayan tonsillit ve hipertrofi etiolojisindeki rollerini aydınlatmada ve hastalık patogenezi hakkındaki anlayışımızı ilerletmede yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Tonsillit, virus



Şekil. Pozitif kontrol olarak kullanılan bazı virüslere ait ampliconların agaroz jel elektroforez görüntüsü [Soldan sağa; 100 bp DNA ladder (Invitrogen), EBV, BK virus, HSV, B19 virus, Adenovirus, ve CMV ampliconları, DNA ladder].

Solunum Yolu Enfeksiyonu Etkenlerinin Moleküler Tanısı

İmran Sağlık¹, Rabia Can Sarınoğlu¹, Derya Mutlu¹, Alphan Küpesiz², Nihal Oygür², Özge Turhan³, Dilara Öğünç¹, Dilek Çolak¹

¹Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

²Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya

³Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Amaç: Bu çalışmanın amacı, solunum yolu enfeksiyonu (SYE) olan hastalarda enfeksiyon etkenlerinin araştırılması için, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Bölümüne gönderilen nazofarengeal örneklerin sonuçlarının değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Ekim 2013 - Nisan 2014 tarihleri arasında 221 hastadan [154 çocuk (0-18 yaş), 87 erişkin], eküvyonla (flocked swab, Copan Diagnostics, İtalya) alınan 241 nazofarengeal sürüntü örneği dahil edilmiştir. Örneklerde 17 virusun [Adenovirus (AdV), Coronavirus (CoV) HKU1, CoV NL63, CoV 229E, CoV OC43, Human Metapneumovirus (hMPN), Human Rhinovirus/Enterovirus (hRV/Entero), Influenza (Flu) A, Flu A/H1, Flu A/H3, Flu A/H1-2009, Flu B, Parainfluenza (PIV) 1, PIV 2, PIV 3, PIV 4, Respiratory Syncytial Virus (RSV)] ve üç bakterinin (*Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) nükleik asitleri tam otomatize multipleks PCR temelli bir mikroarray testiyle (FilmArray Respiratory Panel, BioFire Diagnostics, ABD) araştırılmıştır. Testin duyarlılığı üretici firma tarafından %80-84.5 ve özgüllüğü %100 olarak verilmektedir.

Bulgular: Hastaların ortanca yaş değeri 2.9 (aralık: 0-97) yıl olarak bulunmuştur. Örneklerin 95 (%39.4)'inde etken saptanamamış, 146 (%60.5)'sında en az bir etken saptanmıştır. Çocuklarda (n=154) sırasıyla %40.2 RSV, %24.7 hRV/Entero, %5.2 PIV 3, %4.5 Flu A-B, %3.2 hMPN, %1.9 CoV ve %1.3 AdV saptanmış; 14 örnekte iki, bir örnekte üç ve bir örnekte iki virus ve bir bakteriyel etken tespit edilmiştir. Bakteriyel patojen olarak yalnızca bir çocuk hastada hRV/Entero ve RSV ile birlikte *Bordetella pertussis* saptanmıştır. Erişkinlerde (n=87) %13.8 Flu A-B, %9.2 CoV, %6.9 RSV, %5.7 hRV/Entero, %3.4 PIV 3 ve %2.3 hMPN saptanmış; sadece bir örnekte iki etken tespit edilmiştir. Toplamda örneklerin %6.5'inde çoklu etken saptanmış olup, bunların içinde de en sık hRV/Entero ve RSV tespit edilmiştir.

Sonuç: SYE kliniğinden birden fazla viral ve bakteriyel etken sorumlu olabilmektedir. Bu etkenlerin saptanmasında kısa sürede sonuç veren multipleks PCR temelli yöntemler kolaylık sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: Multipleks PCR, solunum yolu enfeksiyonu etkenleri

Erzurum Yöresinde İnsan Kaynaklı Norovirus Varlığının RT-PCR İle Araştırılması: Doğu Anadolu Bölgesi'nden İlk Tespit

Mehmet Özkan Timurkan¹, Hakan Aydın¹, Osman Aktaş²

¹Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum

²Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum

Noroviruslar, insan ve hayvanlarda gastroenterite neden olan önemli viral etkenler arasında yer almaktadır. Adenovirus ve astrovirus gibi diğer viral gastroenterit etkenleri daha çok çocukluk yaşlarında etkili olmasına karşın, noroviruslar tüm yaş gruplarında etkili olurlar. *Caliciviridae* ailesinin bir üyesi olan noroviruslar 5 farklı genogruba ayrılmaktadır. Bu genogrular içinde G1 sadece insanlarda saptanırken, G2 insan ve domuz, G4 ise insan ve köpeklerde tespit edilmiştir. Bu çalışma, norovirusların bölgemizdeki gastroenteritler içindeki yerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, 2011-2013 yılları arasında Doğu Anadolu Bölgesi'ne hizmet veren Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanelerine, gastroenterit şikayetiyle başvuran, farklı yaş aralıklarında 423 hastadan alınan gaita örneği incelenmiştir. Örneklerde sırasıyla nükleik asit ekstraksiyonu, cDNA sentezi ve PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası jel elektroforezinde 327 baz çifti uzunluğundaki bantlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, 423 gaita örneğinden yapılan RT-PCR analizi sonunda 86 (%19.9) örnekte pozitiflik tespit edilmiştir.

Bu çalışma, norovirus gastroenteritinin Doğu Anadolu Bölgesi ile ilişkili olarak ilk bildirim niteliğinde olup, enfeksiyonunun bölgemizde endemik olduğunu göstermiştir. Çalışmamız ayrıca, ülkemizde yapılacak sürveyans çalışmalarında Doğu Anadolu Bölgesi illerinin de mutlaka bulunması gerekliliğini vurgulamıştır. Ayrıca, ileride yapılacak moleküler epidemiyolojik çalışmalarla, elde edilecek virus suşlarından bir virus bankası oluşturulması ve dünya genelinde bulunan suşlar ile karşılaştırılarak bölgesel aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Gastroenterit, norovirus

PP - 119

Klinik Örneklerden HCV-RNA Saptanmasında İki Farklı Sistemin Karşılaştırılması

Safiye Delice, Selma Gökahmetoğlu, Dilek Çıklacıoğlu

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

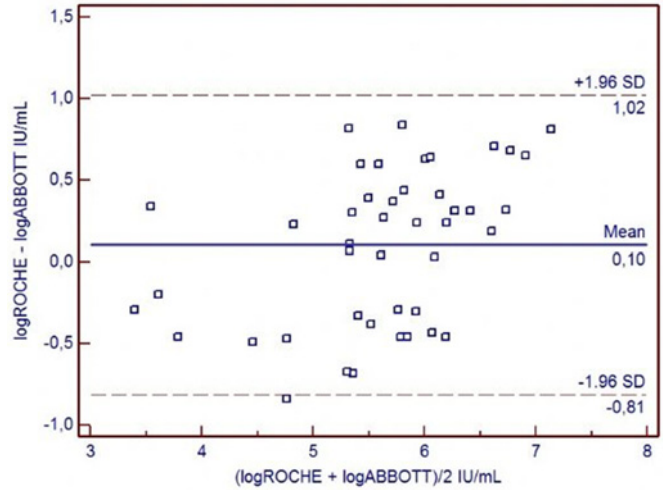
Amaç: Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonlarında, HCV-RNA'sının saptanması ve miktarının ölçülmesi önemlidir. Bu çalışmada, HCV enfeksiyonunun tanısında klinik örneklerden HCV-RNA saptanmasında gerçek zamanlı PCR yöntemlerinden Cobas Ampliprep Taqman 48 HCV2.0 Roche Diagnostics (CAP-CTM) ve Abbott Real-Time (RT) sistemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Laboratuvarına rutin HCV-RNA tayini için gönderilen 134 hasta örneği dahil edilmiştir. Örneklerde HCV-RNA varlığı CAP-CTM sistemi ve Abbott RT yöntemi ile araştırılmıştır. Abbott RT kitinin dinamik aralığı (12-10000000 IU/mL), analitik hassasiyeti 12 IU/ml ve CAP-CTM kitinin dinamik aralığı (15-100000000 IU/mL), analitik hassasiyeti 15 IU/mL olarak verilmektedir. Her iki sistemin dinamik aralığı içinde kantitatif sonuç elde edilen örnekler, korelasyon analizi ve Bland Altman analizi uygulanmıştır.

Bulgular: HCV-RNA ölçümü için gönderilen 134 örneğinin 58'inde (%43.5) her iki sistemle de HCV-RNA saptanamamıştır. CAP-CTM ile <15 IU/ml olarak düşük pozitif bulunan 8 örneğin 3'ünde Abbott RT <12 IU/ml düşük pozitif, 5'inde Abbott RT negatif bulunmuştur. Abbott RT ile <12 IU/ml düşük pozitif bulunan 21 örnek, CAP-CTM ile negatif saptanmıştır. CAP-CTM sistemiyle negatif bulunan 2 örnek, Abbott RT sistemiyle sırasıyla 100 ve 62 IU/ml olarak sonuç vermiştir. Çalışmada, 45 örnekte (%33.5) her iki sistemin dinamik aralıkları içinde kantitatif sonuçlar elde edilmiştir. Her iki sistemle alınan sonuçlar karşılaştırıldığında 45 örnekte 13'ünde (%9.7) logaritmik farkın 0.5log üzerinde olduğu belirlenmiştir. On üç örnekteki logaritmik fark sınırları 0.6log-0.85log arasındadır. Kırk beş örnekte korelasyon analiziyle iyi korelasyon olduğu gözlenmiştir (r: 0.885; p<0.05). Bland Altman analizi ile de her iki sistemin uyumlu olduğu saptanmıştır (Şekil).

Sonuç: Çalışmamızın verileri, HCV-RNA tayininde CAP-CTM ve Abbott RT sistemlerinin sonuçlarının uyumlu olduğu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Hepatit C virus, HCV-RNA



Şekil. Roche CAP-CTM ve Abbott RT sistemleri ile elde edilen Bland-Altman analiz sonuçları.

PP - 120

Böbrek Nakli Yapılan Hastalarda BK Virus Nefropatisinin Tanı ve İzleminde Gerçek Zamanlı PCR Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi-İlk Veriler

Sibel Aydoğan¹, Tuba Müderris¹, Birsan Özdem¹, Ebru Uz², Ziya Cibali Açıkgöz³

¹Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

²Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı, Ankara

³Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Giriş: BK virus (BKV), böbrek transplantasyonlu hastalarda nefropatiye (BKVN) neden olabilen bir virustur. Bu çalışmada, Eylül 2013-Mart 2014 tarihleri arasında, böbrek transplantasyonu yapılan hastalarımızın BKV viral yük ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Toplam 35 hastadan (9 kadın, 26 erkek; yaş ortalaması: 46.4 yıl) alınan serum (122 örnek; 1-8 örnek/hasta) ve idrar (3 örnek; 1-2 örnek/hasta) örneklerinde, BKV viral yük ölçümleri yapılmıştır. Nükleik asit eldesi spin kolon izolasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İdrar örneklerinden izolasyon için sediment ve tam idrar kullanılmıştır. Amplifikasyon ve kantitasyon gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) ile yapılmıştır.

Bulgular: Toplam 35 hastadan 7'sinin (%23) ardışık serum örneklerinde ve biri serum DNA'sı pozitif, diğeri negatif olmak üzere iki hastanın idrar örneklerinde BKV DNA'sı saptanmıştır. Viral yük ölçüm değerleri, serum-pozitif hastaların 2'sinde ≥ 104 kopya/ml; diğerlerinde ise ≤ 103 kopya/ml olarak seyretmiştir. Çalışma süresi içinde, BKV DNA'sı pozitif bulunan bir hastada nefropati gelişmiş ve biyopsi ile doğrulanmış; immünoşüpresif tedavi rejimi düzenlenerek hastalık kontrol altına alınmıştır. Hem idrar hem serum değerleri yüksek bulunan bu hastanın son iki izleminde, serum BKV değeri ≤ 103 kopya/ml düzeyine inmiştir.

Sonuç: Hastanemizde son bir yıl içinde böbrek transplantasyonu gerçekleştirilmeye başlanmış; bu endikasyonla immünoşüpresif tedavi alan hastalarda CMV yanında BKV için de viral yük ölçümünün yapılması ihtiyacı doğmuştur. BKVN izleminde standart ve etkin bir viral yük ölçümü yapılabilmesi esastır. Rt-PCR bu amaca uygun bir seçenek olmakla beraber, henüz FDA onaylı ya da standardize bir ölçüm yöntemi yoktur. BKVN'de primer tedavi yaklaşımı, viral yük izlemi ile erken tanı konması ve immünoşüpresif rejim düzenlenmesi ile tablonun kontrol altına alınması şeklindedir. Tanı ve takipte en uygun örneğin belirlenmesi ve algoritmanın netleştirilebilmesi için, idrar örnekleri ile kan örneklerinin birlikte çalışılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: BK virus nefropatisi, gerçek zamanlı PCR

PP - 121

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi HBV-DNA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ayşe Aynalı¹, Esra Çiftçi¹, Buket Cicioğlu Arıdoğan¹, Emel Sesli Çetin¹, Selçuk Kaya², Süleyman Önal¹, Tuba Öztürk¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta
²İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

Amaç: Serum HBV-DNA düzeyleri, virus replikasyonunu izlemenin ve tedaviye yanıtı değerlendirilmenin önemli bir göstergesidir. Viral yük, hepatoselüler karsinoma (HCC) ve sirozla yakın ilişkili olup, 10⁵ kopya/ml'nin üzerindeki HBV-DNA düzeyi için HCC riski altı kat daha fazla bulunmuştur. Viral yükün saptanması ve takibi, gelişebilecek komplikasyonlar açısından önemlidir. Çalışmamızda, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Tanı Laboratuvarımızın bir yıllık HBV-DNA viral yük dağılım aralığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 1 Ocak 2013- 31 Aralık 2013 tarihleri arasında, 5-88 yaş arasındaki 1.054 hastaya (825'i Enfeksiyon Hastalıkları, 626'sı Gastroenteroloji ve 95'i diğer bölümlerden) ait toplam 1.546 serum örneğinde HBV-DNA varlığı, Cobas/AmpliPrep/Cobas Taqman (Roche, ABD) ve HBV Quantification Kit v1, Magnesia 16 ve Montania 483 (Anatolia Geneworks, İstanbul) sistemleri ile gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılarak üretici firmaların önerileri doğrultusunda araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışılan 1546 örneğin 346'sı (%22.4) negatif, 1200'ü (%77.6) farklı titrelerde pozitif olarak değerlendirilmiştir. HBV-DNA test sonucu pozitif olan 1200 serum örneğinin 354'ü (%29.5) 1-10², 357'si (%29.7) 10²-10³, 263'ü (%21.9) 10³-10⁴, 98'i (%8.2) 10⁴-10⁵, 32'si (%2.7) 10⁵-10⁶, 43'ü (%3.6) 10⁶-10⁷, 18'i (%1.5) 10⁷-10⁸, 32'si (%2.7) 10⁸-10⁹, 3'ü (%0.2) 10⁹ IU/ml ve üzerindeki titrelerde pozitif olarak bulunmuştur.

Sonuç: Bölgemizdeki HBV-DNA pozitif örnekler için viral yük miktarının 1- 10⁵ IU/ml arasında yoğunlaştığı gözlenmiştir. HCC açısından yüksek riskli olduğu bildirilen titrelerle oranla bölgemizdeki viral yük miktarının daha düşük düzeylerde olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: HBV-DNA, gerçek zamanlı PCR

PP - 122

Obez Erişkinlerde Adenovirus-36 DNA'sının ve Nötralizan Antikorların Saptanması: Türkiye'de Erişkinlerde Yağ Dokularında Yapılan İlk Klinik Çalışma (Ön Çalışma)

Sevçi Ergin¹, Eda Altan Tarakçı², Özgür Pilancı³, Serhat Sirekbasan¹, Oğuz Çörtük³, Hüseyin Elbey⁴, Öykü Dinç¹, Nuri Turan², Atilla Arıncı⁴, Valere Goossens⁵, Hüseyin Yılmaz², Bekir Kocazeybek¹

¹İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, İstanbul

³T.C. Sağlık Bakanlığı, Bağıcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği, İstanbul

⁴İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul

⁵Maastricht University Medical Centre, Department of Medical Microbiology, Maastricht, The Netherlands

Amaç: Obezite günümüzde önemli sağlık problemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Multifaktöriyel nedenlere bağlı olarak geliştiği bilinen obezite, son yıllarda önemli viral patojenlerden biri olan insan adenovirus-36 (AdV-36) ile de ilişkilendirilmiştir. Ülkemizde erişkinlerde ilk kez yapılan bu çalışma ile AdV-36'nın obezitedeki önemini araştırmak amacıyla, obez olan ve olmayan kişilerden alınan yağ dokusu örneklerinde AdV-36 DNA'sının PCR yöntemiyle ve eş zamanlı olarak alınan kan örneklerinde virusa karşı oluşan antikorların serum nötralizasyon (SN) testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Olgu-kontrol temelli çapraz kesitsel olarak planlanan bu çalışmada, hasta grubu olarak; Mart 2013 - Şubat 2014 tarihleri arasında İstanbul'da çeşitli hastanelerin Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniklerine başvuran, BMI \geq 30 kg/m² olan ve obez tanısı konan 49 olgu, kontrol grubu olarak da BMI (Body Mass Index) \leq 25 kg/m² olan, estetik amaçla başvuran ve hasta grubuyla aynı sayıda ve obez olmayan 49 kişiden konvansiyonel "liposuction" yöntemi ile alınan yağ dokusu örneği tek aşamalı PCR ve nested PCR yöntemiyle incelenmiştir. Eş zamanlı olarak hasta ve kontrol gruplarının kan örneklerinde AdV-36'ya karşı oluşan nötralizan antikorların varlığı ise, A549 hücre hattında (insan akciğer karsinoma hücre hattı, ATCC-CCL-185) üretilen stok virus (Human Adenovirus-36, ATCC: VR-1610) kullanılarak SN testi ile araştırılmıştır. SN testinde 1:8 ve üstü titrede sitopatik etki oluşturmayan serum örnekleri pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: İncelenen hasta ve kontrol grubunda, yağ dokusu örneklerinde AdV-36 DNA'sı negatif olarak saptanırken, SN testi ile 49 hastanın 6'sında (%12.2) tespit edilen AdV-36 antikor pozitifliği istatistiksel açıdan ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur.

Sonuç: Her ne kadar yağ dokusu örneklerinde AdV-36 DNA'sı bulunmamış olsa da, hasta grubunda saptanan AdV-36 nötralizan antikor varlığı, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de erişkinlerde AdV-36'nın obezite ile ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Adenovirus-36, serum nötralizasyon testi

PP - 123

Antiretroviral Tedavi Almayan Kişilerde HIV-1 Primer İlaç Direnci Mutasyonları

Tülay Yalçınkaya¹, Şükran Köse²

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

²Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir

Antiretroviral tedavi başarısızlığına neden olabilmesi nedeniyle, HIV-1 suşlarında primer ilaç direnci klinik ve epidemiyolojik bir sorun oluşturmaktadır. Bu çalışmada, yeni tanı alan ve antiretroviral ilaç kullanmamış HIV-1 enfeksiyonlu olgularda primer ilaç direncinin saptanması hedeflenmiştir.

Çalışmada, Mart 2010 - Nisan 2014 döneminde 179 olguya (28 kadın, 129 erkek, 22 bilinmeyen; yaş aralığı: 18-72 yıl, ortalama yaş: 36.9 yıl) ait örnek incelenmiştir. Örneklerde ortalama HIV RNA düzeyi 5.38 log₁₀ kopya/ml, CD4 sayısı 294 hücre/mm³ olarak belirlenmiştir.

Primer ilaç direnci mutasyonları Dünya Sağlık Örgütü 2009 yılı ilaç direnci sürveyans listesine göre tanımlanmıştır.

İncelenen 179 örneğin 18'inde (%10.05) mutasyon saptanmıştır. Bunlar; NRTİ (nükleozid revers transkriptaz inhibitörü) direncinden sorumlu M41L, T69S, K70E, M184V, L210W, T215C/D/S; NNRTİ (non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörü) direncinden sorumlu K103N/S, Y181C; Pİ (proteaz inhibitörü) direncinden sorumlu M46L, L90M olarak izlenmiştir. Örneklerin %5.58'inde NRTİ, %2.79'unda NNRTİ ve %2.2'sinde Pİ mutasyonu bulunmuştur. Bir örnekte hem NRTİ hem de NNRTİ mutasyonu, 5 örnekte ise NRTİ direncine neden olan iki mutasyon birlikte saptanmıştır.

Sonuç olarak, HIV-1 suşlarındaki primer ilaç direnci oranının görece olarak yüksek olduğu (%10) ve hastalarda antiretroviral tedaviye başlamadan önce ilaç direnci mutasyonlarının araştırılmasının yol gösterici olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: HIV-1, ilaç direnci

MY09/11 Konsensus PCR'in Çoklu HPV Enfeksiyonlarını Saptama Etkinliği

Fatih Şahiner¹, Ayhan Kubar¹, Ramazan Gümral², Medine Ardic³, Nuri Yiğit⁴, Kenan Şener¹, Murat Dede⁵, Mehmet Yapar¹

¹Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara

²Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Ankara

³Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Ankara

⁴Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

⁵Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara

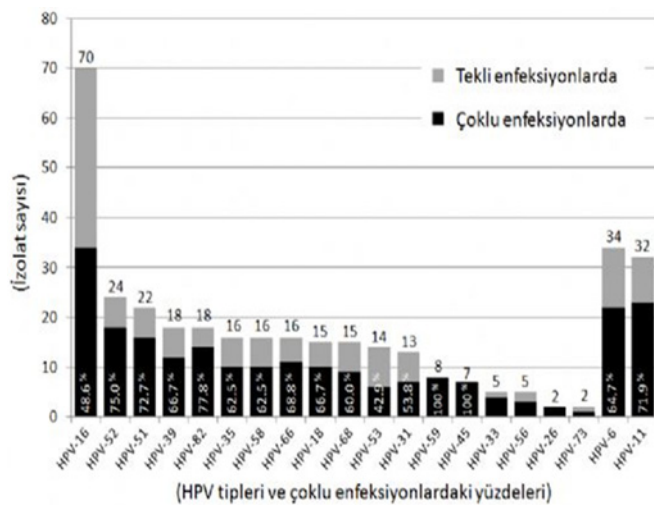
İnsan papillomavirus (HPV)-DNA testleri, günümüzde servikal kanser tarama stratejilerinin önemli bir parçası haline gelmiştir. Bu çalışmada MY09/11 konsensus PCR'in çoklu enfeksiyonları saptama etkinliğini değerlendirmek için; MY09/11 PCR ile 20 farklı HPV tipini saptayabilecek şekilde tasarlanan TaqMan-bazlı bir gerçek zamanlı (real time) PCR yönteminin sonuçları karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya alınan 654 smear örneğinin 223'ü (%34.1), yöntemlerden en az birisi ile HPV-DNA pozitif olarak değerlendirilmiştir. MY09/11 PCR ve tipe özgül PCR'in göreceli duyarlılıkları sırasıyla %80.7 (180/223) ve %97.8 (218/223) olarak bulunmuştur. Pozitif örneklerin %97.8'inde (218/223) tiplendirme analizleri başarılı olarak yapılmış ve toplam 352 farklı HPV izolatu (düşük riskli 66 izolat ve yüksek veya muhtemel yüksek riskli 286 izolat) tanımlanmıştır. HPV-DNA pozitif örneklerin 5'i sadece MY09/11 PCR ile pozitif olarak tanımlanmış ve genotip tayini yapılamamıştır. Tipe özgül PCR ile tanımlanan yüksek veya muhtemel yüksek riskli 286 izolat arasında en sık rastlanılan genotip HPV-16 (%24.5) olmuştur; bunu HPV-52 (%8.4), HPV-51 (%7.7), HPV-39 (%6.3), HPV-82 (%6.3), HPV-35 (%5.6), HPV-58 (%5.6), HPV-66 (%5.6), HPV-18 (%5.2), HPV-68 (%5.2) ve diğer tipler (%19.6) izlemiştir (Şekil).

Tiplendirme analizlerinin başarılı olarak yapıldığı örneklerin %57.3'ünde (125/218) tek ve %42.7'sinde (93/218) çoklu HPV tipi varlığı saptanmıştır. MY09/11 primer sistemi HPV-DNA pozitif örneklerin %19.3'ünde (43/223) HPV-DNA varlığını tespit edemeyen, çoklu ve tekli enfeksiyonları kaçırma oranları sırasıyla %18.4 (23/125) ve %21.5 (20/93) olarak bulunmuştur. Eşzamanlı sitopatolojik incelemelerde, örneklerin %20.9'unda (137/654) sitolojik atipi varlığı saptanmıştır. Atipi görülme oranı tekli enfeksiyonlarda %43.2, çoklu enfeksiyonlarda ise %54.8 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız, MY09/11 konsensus PCR'in tekli ve çoklu HPV tiplerini içeren örneklerin önemli bir bölümünü kaçırdığı göstermiştir. Bu verilere dayanarak, servikal kanser taramalarında tipe özgül PCR testlerinin hasta bazında daha güvenilir sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: İnsan papillomavirus (HPV), genotip



Şekil. Tipe özgül PCR ile saptanan HPV tiplerinin dağılımı.

Servikal Örneklerde İnsan Papillomaviruslarının Moleküler Yöntemler Kullanılarak Araştırılması, Tiplendirilmesi ve Sitolojik Sonuçların Değerlendirilmesi

Berrin Uzun¹, Aslı Gamze Şener¹, İrem Onur Paker², Serdar Güngör¹, İlhan Afşar¹, Mustafa Demirci¹

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

²İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Laboratuvarı, İzmir

Amaç: İnsan papillomavirus (HPV) ile ilişkisi kanıtlanmış olan servikal kanser, kadınlar arasında dünya genelinde ikinci en sık görülen kanserdir. HPV enfeksiyonunun başlangıcı ile servikal kanser gelişimi arasında uzun bir latent dönemin bulunması nedeniyle servikal kanserler tarama programlarıyla erken evrelerde saptanabilmektedir. Günümüzde servikal kanser tarama programlarının önemli bir parçası olan HPV-DNA testleri dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada HPV açısından risk faktörlerine sahip kadınlarda gerçek zamanlı (real time) PCR yöntemi kullanarak HPV-DNA varlığının araştırılması, tiplendirilmesi ve belirlenen HPV tiplerinin servikal sitoloji sonuçlarıyla uyumunun incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, Ocak 2009-Aralık 2012 tarihleri arasındaki HPV-DNA sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. HPV pozitifliği ve tiplerinin, servikovajinal smear sonuçlarıyla uyumu değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 371 servikal örnekte HPV-DNA saptama oranı %48 (n:177)'dir. Pozitif saptanan örneklerin tiplendirilmesinde; HPV-16 %26.5, HPV-18 %5.5, diğer yüksek riskli (HR) HPV tipleri (HPV-31, HPV-35, HPV-59) %40, muhtemel HR-HPV (HPV-66) %1.5 ve düşük riskli HPV tipleri (HPV-6, HPV-11) %27.5 oranında saptanmıştır. HPV tipleri ve epitelyal hücre anormallığı birliktelikleri tabloda izlenmektedir.

Sonuç: HPV tip 16-18 dışı HR-HPV özellikle sitolojik anomali olmayan grupta ilk sırada, HPV-16 üçüncü sıklıkta; sitolojik anomaliye sahip grupta da tip 16-18 dışı HR-HPV ve HPV-16 birbirlerine yakın oranlarda izlenmekte ve bu izolatlar preinvazif lezyonlara eşlik etmektedirler.

Anahtar sözcükler: İnsan papillomavirus (HPV), genotip

Tablo. HPV tipleri ve epitelyal hücre anormallığı birliktelikleri

HPV Pozitif	EHA Negatif (n:317) Sayı (%)	EHA Pozitif (n:54)				Toplam Sayı (%)	Genel Toplam (n:371) Sayı (%)
		ASCUS (n:10)	LSIL (n:27)	HSIL (n:16)	SHK (n:1)		
Yüksek riskli (HR)	HPV-16	34 (24.1)	2	3	8	-	13 (36) 47 (26.5)
	HPV-18	5 (3.6)	-	1	2	-	3 (8) 8 (4.5)
	16-18 dışı	58 (41.1)	1	4	6	1	12 (33) 70 (40)
Muhtemel HR	1 (0.7)	-	2	-	-	-	2 (6) 3 (1.5)
Düşük riskli	43 (30.5)	2	4	-	-	-	6 (17) 49 (27.5)
Toplam	141(100)	5	14	16	1	36(100)	177 (100)
HPV Negatif	176	5	13	-	-	18	194

EHA: Epitelyal hücre anormallığı; SHK: Skuamöz hücreli karsinom.

Kolorektal Karsinomlu Hastalarda Gerçek Zamalı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile İnsan Papillomavirus Tip 16 Pozitifliğinin Gösterilmesi

Ayça Özer Durmuşlu¹, Gülemdam Bozdayı¹, Aylin Altay¹, Özgür Ekinci², Ayşe Dursun², Erdal Birol Bostancı³, Musa Akoğlu³, Sezai Leventoğlu⁴, Seçil Özkan⁵, Bedia Dinç⁶

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

³S.B. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Ankara

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara

⁵Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara

⁶S.B. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kolorektal karsinomlu hastalarda gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) yöntemi ile HPV ve HPV tip 16 pozitifliğinin; yaş, cinsiyet, tümör yeri, evresi, histolojik tipi ile ilişkisi olup olmadığının belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, kanserli hastalardan 121 parafin blok, 87 taze doku biyopsisi ve kontrol grubu olarak 107 kanser olmayan parafinli doku örnekleri dahil edilmiştir. Parafinli doku örnekleri ksilenle deparafinize edilmiştir. Deparafinize ve taze doku örneklerinin; fenol kloroform izoamil alkol yöntemiyle DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonda MY09/MY11 primerleri kullanılarak L1 bölgesi çoğaltılmıştır. Rt-PCR, MY09/11 ürünleri, GP5+/GP6+ primerleri ve *Cyanine-5 labeled HPV-16 DNA specific probe* ile LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında çalışılmıştır.

Bulgular: Hasta örneklerinin %19'u HPV pozitif, HPV pozitif saptanan hastaların %34.1'i HPV-16 olarak saptanmıştır. HPV pozitif örneklerin %18.6'sı 50 yaş altı; %23.3'ü 50-59 yaş arası ve %5.8'i 60 yaş üzerindedir. HPV-16 pozitif olan hastaların ise %13'ü 50 yaş altı, %26'sı 50-59 yaş arası ve %60'ı 60 yaş üzerindedir. HPV(+) hastaların %31.8'i kadın; %68.2'si erkektir. HPV pozitif ve HPV-16 pozitif tümörlerin sırasıyla %44.2 ve %9.1'i rektumda %55.8'i ve %5.6'sı kolondadır. İyi diferansiyel tümörlerin %12.3'ü, orta diferansiyel tümörlerin %24.3'ü ve az diferansiyel tümörlerin %21.4'ü HPV pozitifdir. HPV-16 pozitif tümörlerin %6.7'si iyi; %60'ı orta ve %26.7'si az diferansiyeldir. Kontrol grubunun %19.6'sında HPV DNA varlığı saptanmıştır. Parafin dokuda HPV pozitifliği %14, taze dokuda ise %31 oranında bulunmuştur. Kolorektal tümörlerde HPV pozitifliği ile hastaların yaş, cinsiyet, tümörlerinin yeri, derecesi ve histolojik tipi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak yaş ilerledikçe HPV pozitifliğinin arttığı görülmüştür. Cinsiyet açısından bakıldığında erkeklerde HPV pozitifliği kadınlardan daha fazladır.

Sonuç: Çalışmamızın verileri, kolon kanseri ile HPV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: İnsan papilloma virus, kolorektal kanser

Kronik Hepatit C Virus (HCV) Enfeksiyonu Tanısı İle Takip Edilen Hastalarda HCV Genotip Dağılımının Araştırılması

Sibel Aydoğan¹, Fisun Kırca¹, Nevreste Çelikkbilek¹, Gülay Ceylaner², Ziya Cibali Açıkçöz³

¹Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

²Intergen Genetik Merkezi, Ankara

³Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Kronik hepatit C virus (HCV) enfeksiyonlu hastalarda viral genotip (Gt) tayini, tedaviye yanıtın ve tedavi süresinin belirlenmesinde önem taşır. Bu çalışmada 2009-2013 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen, kronik HCV enfeksiyonlu hastalara ait örneklerin HCV Gt tayin sonuçları değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışma süresince toplam 173 hasta (75 erkek, 98 kadın; yaş ortalaması: 55.9±12.3 yıl) örneği incelenmiştir. RNA

izolasyonu QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile; amplifikasyon ve kantitasyon, gerçek zamanlı PCR ile (Artus HCV RG RT-PCR kiti) gerçekleştirilmiştir. Genotiplendirme, virus genomunun 5'UTR bölgesini hedefleyen primerler kullanılarak dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır.

Bulgular: Gt tayini yapılan yıllık hasta sayısı; 2009-2013 aralığında sırasıyla 15, 25, 25, 44 ve 64'tür. Toplam 154 (%89) hastada Gt-1 (141'inde 1b, 9'unda 1a, 4'ünde 1); 4 (%2.3) hastada Gt-2; 6 (%3.5) hastada Gt-3, (4'ünde 3a, 2'sinde 3); 5 (%3) hastada Gt-4a saptanmış; HCV RNA düzeyleri düşük 4 (%2.3) hastada ise sonuç alınmamıştır. Genotiplere göre HCV RNA düzeyleri incelendiğinde medyan değerleri, Gt-1-4 için sırasıyla 6.2 (<40-8.2), 5.75 (5.0-6.4), 5.47 (<40-7.0) ve 4.98 (<40-6.92) log₁₀ kopya/ml olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Sonuçlarımız, ülkemizde bilinen Gt-1b sıklığını desteklemektedir. İncelenen hastalardan Gt-3a olarak saptanan 4 hasta (Afganistan, Kırgızistan, Türkmenistan, Ukrayna) ile Gt-2 olarak saptanan 1 hasta (Gürcistan) dışında kalanların tümü Ankara ve çevre illerden gelmiştir. Genotiplerin sayısal dağılımı elverişli olmadığından, genotiplerle viral yük düzeyleri arasında ilişkilendirme yapılamamıştır. Son olarak, saptanan yıllık kronik HCV enfeksiyonu sayısındaki artış dikkat çekicidir ve bu durum, enfeksiyonun ülkemiz için giderek artan ölçekte bir sağlık sorunu olacağına işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: Hepatit C virus, genotip

Ailevi Akdeniz Ateşi ve TT Virus (TTV) Birlikteliğinin Araştırılması

Ahmet Özbek¹, Mutlu Karakucak², Ali Rıza Atasoy¹, Engin Karakeçe¹, İhsan Hakkı Çiftçi¹, Mehmet Köroğlu¹

¹S.B. Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya

²S.B. Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Laboratuvarı, Sakarya

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA), 16. kromozomun kısa koluyla ilişkili otozomal resesif geçişli, klinikte en sık nöbetler halinde tekrarlayan karın ağrısı ve ateş atakları ile, serolojik olarak da akut faz reaksiyonları ve fibrinojen yüksekliği ile seyreden bir tablodur. Transfüzyonla bulaştığı ifade edilen ancak gaita örneklerinde de gösterilen TTV'nin patogenezi ise tm olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, akut AAA atağı geçiren hastalardan mutasyon analizi için alınmış ve AAA hastalığı genetik düzeyde tanımlanmış hastaların serum örneklerinde, retrospektif olarak TTV varlığı araştırılmış ve AAA'nin tetiklenmesinde bir etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma, Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik ve Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarlarının eşgüdümünde, laboratuvar arşivinde bulunan 26'sı AAA ve 20'si sağlıklı kişilere ait 46 kan örneği ile yapılmıştır. DNA izolasyonu için QIAamp® DNA Mini Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. TTV çalışmaları ticari kit TTV QLS® 1.0 (İontek, Türkiye) kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Fluorion®, İontek, Türkiye) ile üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Sağlıklı kişilerin ve genetik olarak doğrulanmış AAA hastaların kan örneklerinde TTV-DNA pozitiflik oranları sırasıyla %10 (2/20) ve %11.5 (3/26) olarak bulunmuştur. TTV ile AAA arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Önceleri idiyopatik ailevi poliserozitis olarak adlandırılan AAA'de temel patogenezi, bir otoenflamasyon reaksiyonu oluşturmaktadır. Bu da bağışıklık sisteminin yanlış ve aşırı yanıt vermesine sebep olmaktadır. Bu otoenflamasyon reaksiyonunun tetiklenmesinde TTV'nin etkisinin araştırılmasını hedeflediğimiz bu çalışmada, ilişkiyi gösterecek istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır.

Anahtar sözcükler: Ailevi akdeniz ateşi, TT Virus

PP - 129

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine Başvuran Yetişkin Olgularda Hepatit E Virus IgG Seropozitifliğinin Araştırılması

Nesibe Nur Aydın, Koray Ergünay, Ahmet Pınar, Aydan Karagül, Dürdal Us

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Oral-fekal yolla bulaşan ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde su kaynaklı salgınlara neden olan hepatit E virusu (HEV) ile ilgili son yıllarda elde edilen veriler, virusun gelişmiş ülkelerdeki bulaşının zoonotik özellik taşıdığını göstermektedir. Ülkemizde HEV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ile ilgili veriler sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine çeşitli nedenlerle başvuran olgularda HEV IgG seropozitifliğinin araştırılması ve bölgemizdeki HEV insidansının belirlenerek ülkemizin seroepidemiolojik verilerine katkı sağlanmasıdır. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına, Mayıs 2013-Kasım 2013 tarihleri arasında gönderilen 930 erişkin olguya (461 kadın, 469 erkek; yaş aralığı: 18-90 yıl) ait serum örneği dahil edilmiştir. Örneklerde HEV IgG antikorlarının varlığı ticari bir ELISA kiti (Euroimmun, Almanya) kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda, 930 erişkin olgunun 43'ünde anti-HEV antikorları pozitif, 887'sinde ise negatif olarak bulunmuş; HEV IgG seropozitifliği %4.6 olarak saptanmıştır. Olguların cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde; seropozitiflik oranının kadınlarda (28/461; %6.07) erkeklere göre (15/469; %3.2) daha yüksek olduğu izlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Çalışmamızın verileri, anti-HEV seropozitifliğinin yaş ile birlikte yükseldiğini göstermektedir. Seronegatif (n=887) olguların yaş ortalaması 40.4±15.2 yıl iken, seropozitif (n=43) olguların yaş ortalaması 59.1±16.8 yıl olarak hesaplanmış ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

Sonuç olarak çalışmamızda, bölgemizdeki yetişkin popülasyonda saptanan %4.6'lık seropozitiflik oranı, Ankara'da 2002 yılında Cesur ve arkadaşları tarafından bildirilen oran (%3.8) ile benzerlik göstermiş ve zaman içerisinde bölgemizde belirgin bir artışın olmadığını düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Hepatit E virusu, seroprevalans

PP - 130

Yoğun Bakım Ünitelerinden Gelen Solunum Yolu Örneklerinde CMV DNA Varlığı ve IL-6 Düzeylerinin Araştırılması

Başak Kaman, Işıl Fidan, Funda Doğruman Al, Zübeyde Lale, Seyyal Rota

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Sitomegalovirus (CMV), özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu hastalarda, aktif CMV enfeksiyonu, inflamasyonlu dokularda sınırlı olabildiği gibi, etken hem bu dokularda hem de kanda tespit edilebilir. Bu çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara ait solunum yolu örneklerinde CMV DNA varlığının araştırılarak, plazma örneklerinde CMV DNA varlığı ile karşılaştırılması ve ayrıca proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın solunum yolu örneklerinde CMV DNA ile birlikteliğinin olup-olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya, Mart 2013-Eylül 2013 tarihleri arasında laboratuvarımıza yoğun bakım ünitelerinden gönderilen 66 hastaya ait solunum yolu ve plazma örneği dahil edilmiştir. Solunum yolu örneklerinin 46'sı bronkoalveolar lavaj (BAL), 16'sı endotrakeal aspirat (ETA), 4'ü de balgam örneğidir. Solunum yolu ve plazma örneklerinde CMV DNA varlığı gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırılmış; solunum yolu örneklerinde IL-6 varlığı ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmamızda, 66 solunum yolu örneğinin 37'sinde CMV DNA pozitif olarak bulunmuştur. Solunum yolu örneklerinde CMV DNA'sı po-

zitif bulunan hastalara ait plazma örneklerinin 30'unda CMV DNA pozitifliği belirlenmiştir. Ayrıca, CMV DNA'sı pozitif solunum yolu örneklerinde, negatif örneklere göre IL-6 düzeyleri daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda aktif CMV enfeksiyonunun sadece solunum yolunda sınırlı kalmadığı, sistemik yayılımla birlikte labileceği görülmüş ve CMV DNA varlığının solunum yollarında inflamasyona eşlik ettiği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Sitomegalovirus, solunum yolu

PP - 131

Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus ve Adenovirus Sıklığı

Yusuf Afşar¹, Mesut Bulut¹, Hülya Seyed Oskovi², Ümmü Gül Erdem¹

¹Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
²Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

Amaç: Akut gastroenteritler, çocukluklarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerindedir. Rotavirus ve enterik adenoviruslar, çocukluk çağında en sık görülen gastroenterit etkenleridir. Rotavirus ve enterik adenovirus gastroenteritlerinin bölgemizdeki epidemiyolojisi iyi bilinmemektedir. Bu çalışmada, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran çocuk hastalarda rotavirus ve enterik adenovirus kaynaklı gastroenterit sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Nisan 2013-Nisan 2014 tarihleri arasında hastanemize ishal şikayeti ile başvuran 3.894 hastanın dışkı örneklerine ait kayıtlar retrospektif olarak incelenmiştir. Örneklerde rotavirus ve adenovirus antijenlerinin saptanması için ticari bir immüno-kromatografik yöntem (Rota-Adeno Card, CerTest Biotec, İspanya) kullanılmıştır.

Bulgular: Dışkı örneklerinin 547'sinde (%14) viral antijen pozitifliği saptanmış; 512 (%93.6) örnekte rotavirus, 35 (%6.3) örnekte adenovirus, 2 (%0.3) örnekte ise rotavirus+adenovirus birlikte pozitif olarak tespit edilmiştir. Viral antijenler en sık 2 yaş grubundaki hastalarda görülmüştür.

Sonuç: Küçük çocuklarda (0-5 yaş) akut gastroenterit etyolojisinde en önemli etkenler olan rotavirus ve adenovirus, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli morbidite nedenlerindedir. Bu enfeksiyonların epidemiyolojik özellikleri ve görülme sıklığının klinisyenlerce iyi bilinmesi, tanı ve tedavi yaklaşımları için önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Rotavirus, adenovirus

PP - 132

HBV-DNA Pozitif Akut ve Kronik Hepatit Hastalarında Delta Antikoru ve HDV-RNA Sıklığı

Merve Aydın, Aytekin Çıkman, Barış Gülhan

Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan

Hepatit D virusu (HDV; Delta ajanı), konakta hastalık oluşturabilen için Hepatit B virusu (HBV)'na gereksinim duyan defektif bir virustur. Akut ve kronik hepatitlere neden olan HDV'nin ilimizdeki durumu hakkında herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Erzincan ilinde HBV-DNA pozitif akut ve kronik hepatit B hastalarında anti-HDV antikorları ve HDV-RNA sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, Ocak 2013-Nisan 2014 tarihleri arasında akut ve kronik hepatit B tanısı ile takip edilen hastalar dahil edilmiştir. Gerçek zamanlı (Rt)-PCR yöntemiyle HBV-DNA (Bosphore HBV Quantification Kit v1, Anatolia Geneworks, İstanbul) pozitif saptanan hastalarda, ELISA yöntemi ile delta antikoru (HDV Ab, Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl, İtalya) araştırılmıştır. Delta antikoru pozitif saptanan

serum örneklerinde, Rt-PCR yöntemi ile HDV-RNA (Bosphore HDV Quantification Kit v1, Anatolia Geneworks, Türkiye) varlığı araştırılmıştır.

Çalışmaya 88'i kadın, 115'i erkek olmak üzere toplam 203 hasta dahil edilmiştir. Hastaların yaş aralığı 16-78 yıl ve yaş ortalaması 40.50 yıldır. Rt-PCR yöntemi ile HBV-DNA pozitif saptanan 203 hastanın 6'sında (%3) delta antikoru, 5'inde (%2.5) ise HDV-RNA pozitif olarak tespit edilmiştir. HDV-RNA pozitif saptanan hastaların viral yükleri 5×10^3 ile 32×10^5 arasında bulunmuş olup, viral yük ortalamaları 22×10^4 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, bölgemizdeki akut ve kronik hepatit B hastalarında saptadığımız delta antikoru ve HDV-RNA sıklığı ülkemiz verileri ile benzerlik göstermektedir. HDV enfeksiyonunun azaltılması için HBV'ye karşı aşılanmanın yanı sıra, HBsAg pozitif olgularda koruyucu önlemlerin alınması uygun yaklaşım olacaktır.

Anahtar sözcükler: Hepatit D virusu, HDV-RNA

PP - 133

Bursa bölgesinde HCV genotip dağılımının belirlenmesi

Harun Ağca, Kadir Efe, Burcu Dalyan Cilo

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

Amaç: Hepatit C virusu (HCV), dünyada ve ülkemizde hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomun önemli bir nedenidir. Altı genotipi ve 100 civarında türümsü tanımlanmış olan HCV enfeksiyonunun seyri ve tedaviye yanıtı genotip ile ilişkilidir. HCV genotiplerinin bilinmesi epidemiyolojik verilerin belirlenmesi açısından da önemlidir. Bu çalışmada, Güney Marmara Bölgesi'nin referans merkezi olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerde HCV genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, Ocak 2013- Aralık 2013 döneminde laboratuvarımıza genotipleme için gönderilen HCV enfeksiyonu olan 58'i erkek (yaş ortalaması: 56 yıl) ve 61'i kadın (yaş ortalaması: 56.3 yıl) olmak üzere 119 hastanın serum örnekleri ile retrospektif olarak yapılmıştır. Çalışmada, HCV RNA tespiti için Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında Artus HCV QS-RGQ PCR kiti (Qiagen, Almanya) ve Abbott RT 2000 (Abbott, ABD) cihazında Abbott HCV Genotype (Abbott, ABD) kiti kullanılmıştır. HCV RNA pozitif bulunan hastalarda, *Linear Array HCV Genotyping Test* (Roche, ABD) kiti veya *Abbott HCV Genotype* (Abbott, ABD) kiti ile HCV genotip belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 119 hastadan 111'inin (%93.3) genotip 1, 6'sının (%5) genotip 3, 2'sinin (%1.7) ise genotip 4 ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Hastalardan 15'inin yurt dışında doğmuş olduğu, bu hastaların tamamında HCV genotip 1'in tespit edildiği ve bu 15 hastadan 12'sinin (%80) Bulgaristan doğumlu olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçları, ülkemiz verileriyle uyumlu olarak en yaygın görülen HCV tipinin genotip 1 olduğunu, genotip 3 ve 4'ün ise daha az görüldüğünü ortaya koymaktadır. Ülkemizde ve bölgemizde en sık olduğu saptanan genotip 1'in önemi; kronik hepatit C hastalığında antiviral tedaviye direncin fazla olması ve daha uzun süre tedavi gerektirmesidir.

Anahtar sözcükler: HCV, genotip

PP - 134

Transplantasyon Yapılan Hastalarda BK ve JC Virus Sıklığı

Fatma Esenkaya Taşbent, Mehmet Özdemir, Mahmut Baykan

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

Amaç: *Polyomaviridae* ailesi içinde yer alan BK ve JC virusları, çocukluk döneminde kazanılan ve primer enfeksiyon sonrası renal ve

üriner sistemde latent olarak kalan viruslardır. Bu viruslar, böbrek ve kemik iliği transplantasyonu gibi immün süpresif tedavi uygulanan hastalarda reaktif olarak ciddi klinik tablolara neden olabilirler. Dolayısıyla transplantlı hastaların viral yük açısından takibi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, renal transplantasyon yapılan hastalarda BK ve JC virus sıklığının belirlenmesidir. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde böbrek transplantasyonu yapılan 106 hasta (yaş aralığı: 38-59 yıl; yaş ortalaması: 48.2 yıl) dahil edilmiştir. Hastalardan transplantasyon sonrası 3-65. aylar arasında alınan idrar örneklerinde BK ve JC virus DNA'ları gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, 106 hastanın 6'sında (%5.66) BK ve 2'sinde (1.89%) JC virus DNA pozitifliği tespit edilmiştir.

Sonuç: Renal transplantasyon hastaları yoğun immün süpresyon altında olduğundan, bu hastalarda CMV'nin yanı sıra, reaktif olma potansiyeli nedeniyle BK ve JC viruslarının da, böbrek hasarının takibi açısından araştırılması ve bu uygulamanın rutin tanı yöntemleri arasında yer alması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: BK virus, JC virus, transplantasyon

PP - 135

Afyon, Karabük ve Konya İllerinde Rotavirus Genotip Dağılımındaki Güncel Durum

Mustafa Altındış¹, Sevil Öztaş², Gülşah Aşık³, Sümeyra Acar⁴, Alper Karagöz⁴, Recep Keşli³, Rıza Durmaz⁴

¹Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

²Karabük Devlet Hastanesi, Karabük

³Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon

⁴Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara

Rotavirus, ülkemizde ve dünyada yenidoğan ve 5 yaş altı çocuklarda görülen gastroenteritlerin en yaygın ve önemli sebeplerinden biridir. Bu çalışmada, üç farklı ilden (Afyon, Karabük ve Konya) izole edilen rotavirusların moleküler epidemiyolojisinin araştırılması ve genotip dağılımının güncel durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Anılan illerde Eylül 2012-Kasım 2013 tarihlerinde ishal yakınması ile başvuran ya da akut gastroenterit tablosu ile yatırılan, rotavirus aşısız 0-5 yaş arası çocukların dışkı örnekleri, immünokromatografik test kiti (BioMerieux, France) ile değerlendirilmiş, pozitif bulunan 201 dışkı örneği, bir proje kapsamında, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında genotiplendirilmiştir. Rotavirusların G ve P genotiplendirilmesi için konsensus primerler ile G ve P tipe özgül primerlerin aynı anda kullanıldığı kısa sürede sonuç verebilen *seminested*-multiplex polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır. G ve P tiplendirilmesi için elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek değerlendirilmiştir.

Afyon bölgesi için akut gastroenteritli 492 çocuğun dışkı örneklerinin 100'ünde (%20.32) rotavirus antijeni, 488 çocuğun 16'sında (%3.28) adenovirus antijeni pozitif bulunmuştur. Toplam 201 rotavirus pozitif örnek, Afyon (n:100), Karabük (n:57) ve Konya (n:44) illerinden toplanmış olup, olguların %60.1 (121/201) erkek, %38.3'ü (77/201) 0-12 ay yaş grubundadır. Pozitif örnekler daha çok Kasım 2012-Mart 2013 dönemine aittir. En yaygın G9 (%65) bulunmuş olup, diğer G genotipleri sırasıyla %22 G1, %1 G4, %10 G2, %1 G8 ve %0.5 G10 şeklindedir. P genotiplerinin %81'ini P[8], %19'u P[4]'dür. En sık G ve P kombinasyonları; G9P[8] (%52), G1P[8] (%18), G9P[4] (%13) olup, diğerleri G1P[4], G2P[8], G4P[8], G2P[4], G1G9P[4], G10P[8], G2G9P[8], G4P[4] (%13)'dür.

Önceki yıllarda ülkemizde daha çok G1P[8] ve G3P[8] genotipleri sık saptanırken günümüzde G9P[8] ile yoğun olarak karşılaşılmaktadır. Bu çalışma, aşı sonrası ülkemiz rotavirus genotip dağılımına da veri sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: Rotavirus, genotip

PP - 136

Adıyaman İlinde HBV-DNA Prevalansının Retrospektif Değerlendirilmesi

Sadık Akgün¹, Gülnur Tarhan¹, Burak Ekrem Çitil², Hakan Sezgin Sayiner³, Ömer Faruk Erbil⁴, Selçuk Aksöz⁵

¹Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman

²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Muğla

³Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman

⁴T.C.Sağlık Bakanlığı Adıyaman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Adıyaman

⁵T.C.Sağlık Bakanlığı Adıyaman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Adıyaman

Hepatit B virusu (HBV) akut ve kronik hepatit, siroz, hepatosellüler karsinoma gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açan ve yılda bir milyondan fazla kişinin ölümüne neden olan önemli bir etkidir. Dünyada yaklaşık 350 milyon, Türkiye'de 5 milyon kişi HBV ile enfektedir. Hepatit B'nin tanısında serumda HBV DNA tespiti en duyarlı yöntemdir. Yeni kazanılmış bir HBV enfeksiyonunda bu testin yüksek olması bulaşıcılık oranının yüksek olduğunu, kronik hepatit B hastalığı olan kişilerde yüksek olması ise hepatitin derecesinin yüksek olduğunu göstergesidir.

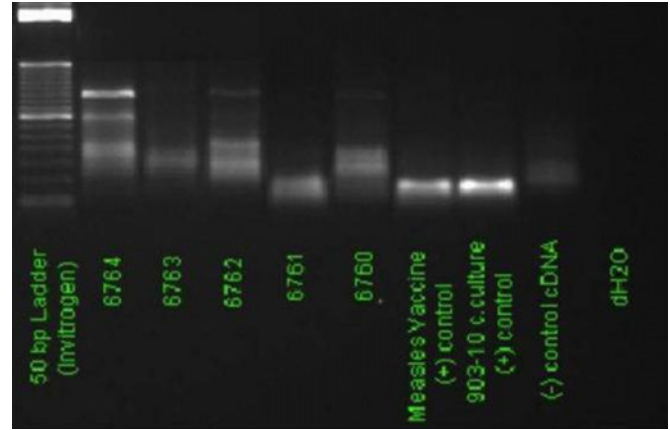
Bu çalışmada, Nisan 2012 ile Nisan 2014 tarihleri arasında, T.C. Sağlık Bakanlığı Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve makroELISA yöntemlerinden herhangi biri ile test sonucu sınıır değerinden yüksek bulunan 4752 olgunun (2789 erkek, 1963 kadın) serum örnekleri, HBV DNA gerçek zamanlı PCR (Fluorion Detection System, Iontek, Türkiye) ile değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre erkeklerin 1477'sinde (%52.96) ve kadınların 1084'ünde (%55.22) HBV DNA pozitif olarak saptanmıştır. Toplam hasta grubundaki pozitiflik oranı ise %53.89 (n=2561) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, ilimizde HBV enfeksiyonları yüksek oranda görülmektedir. Bu nedenle nükleik asit saptama tetkiklerinin takibinin yapılarak periyodik olarak bildirilmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca bu alanda daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Hepatit B, HBV DNA

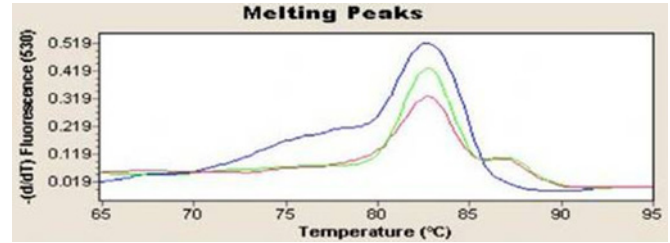
Kızamık aşısı ve bir hastadan hücre kültürü yöntemiyle elde edilmiş kızamık suşu pozitif kontrol, Yeditepe Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran 6 sağlıklı kan donöründen elde edilen tam kan örnekleri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan araştırmalarda, SSPE'ye sebep olan kızamık virusu suşlarında N (nükleoprotein) geni tarafından kodlanan RNA'nın en fazla rastlanılan viral transkript olması nedeniyle, N geninin amplifiye edilmesine karar verilmiştir.

Çalışmamızda, bir SSPE hastasının tam kan örneğinden pozitif sonuç alınmış; ancak diğer hastalarda N RNA'sının varlığı tespit edilememiştir. Sonuç olarak, eş-zamanlı PCR validasyonu bir pozitif sonuçla doğrulanmıştır. İleriki çalışmalarda, internal kontrol ve özgüllüğü daha yüksek prob, vb. kullanılarak daha kapsamlı analiz imkanı sunan multipleks eş-zamanlı PCR uygulamaları ve sekanslama ile birlikte yapılan detaylı moleküler analizler, SSPE teşhisinde daha tutarlı ve güvenilir sonuçların elde edilmesi için gereklidir.

Anahtar sözcükler: Kızamık virusu, SSPE



Şekil 1. Pozitif hastanın, pozitif kontrol ve diğer negatif hastalarla birlikte jel elektroforezi sonucu (Eş zamanlı PCR ile pozitifliği tespit edilen hastanın, yine pozitif kontrol ve diğer negatif hastalarla birlikte yürütüldüğü jel elektroforezi incelendiğinde, ürünlere ait bantların beklenen yerlerde çıkması sonucunda pozitiflik bir kere daha doğrulanmıştır).



Şekil 2. Pozitif kontrollerle birlikte pozitif hastanın eş-zamanlı PCR sonucu (Kızamık aşısı (mavi) ve hücre kültürü yöntemiyle üretilen kızamık suşu (yeşil) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hasta (pembe) ve pozitif kontrollerden elde edilen N genine ait amplifiye ürünlerin aynı erime noktasında pik verdiği görülmüş ve hasta pozitif olarak kabul edilmiştir).

PP - 137

Subakut Sklerozan Panensefalit (SSPE) Hastalarından Toplanan Periferik Tam Kan Örneklerinde Eş-Zamanlı PCR Yöntemiyle Kızamık RNA'sının Araştırılması

Nermin Başak Şentürk¹, İskender Karaltı², Güher Saruhan Direskeneli³, Gülay Korutürk⁴, Gülден Çelik¹

¹Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul

³İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

⁴T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

Subakut sklerozan panensefalit (SSPE), kızamık enfeksiyonu sırasında mutasyona uğramış kızamık virusunun dormant haldeyken beyine yerleşmesiyle, hastalık geçirildikten yıllar sonra aktif hale geçerek beyinde geri dönüşü olmayan tahribatlara yol açan ölümcül bir hastalıktır. SSPE'nin teşhisinde kızamık virusunun araştırılması için eş-zamanlı PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar, en güvenilir pozitif sonuçları vermesi bakımından genellikle beyin biyopsi materyallerinin kullanımına dayanmaktadır. Ancak 2002'de kan örnekleriyle yapılan bir çalışmada pozitif sonuçlara rastlanması, hedef materyal olarak beyin yerine daha hızlı ve kolay elde edilen kan örneklerinin kullanımının önünü açmıştır. Bu çalışmada, klinik ve serolojik olarak SSPE tanısı konmuş 28 hastadan toplanan tam kan örneklerinde, SYBR Green boyama tekniği kullanılarak eş-zamanlı PCR yöntemiyle kızamık RNA'sının araştırılması amaçlanmıştır.

PP - 138

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi HCV-RNA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Buket Cicioğlu Arıdoğan¹, Ayşe Aynalı¹, Esra Çiftçi¹, Tuba Öztürk¹, Selçuk Kaya², Süleyman Önal¹, Emel Sesli Çetin¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta

²Izmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

Amaç: HCV enfeksiyonu %80-85 oranında kronikleşerek, kronik karaciğer hastalığı, siroz ve hepatosellüler karsinoma tablolarına yol açmaktadır. HCV enfeksiyonu şüphesine rağmen anti-HCV negatifliği ve yalancı pozitiflik gibi durumların netleştirilmesinde, tedavi planlanması ve takibinde altın standart HCV-RNA testi ile viral

PP - 140

Sakarya Bölgesinde Mevsimsel İnfluenza Tip A ve B Virüslerinin Moleküler Tanısı

Mustafa Altındaş¹, Oğuz Karabay², Mehmet Köroğlu¹, Ali Rıza Atasoy¹, Yusuf Aydemir³, Ertuğrul Göçlü², Mehmet Karacan⁴, İhsan Hakkı Çiftçi¹, Ahmet Özbek¹, Ali Fuat Erdem⁵

¹Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Sakarya

³Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları ve TBC Kliniği, Sakarya

⁴Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatri Kliniği, Sakarya

⁵Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anestezi ve Reanimasyon Kliniği, Sakarya

İnfluenza A ve B virüsleri, insan solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan etkenlerden olup, önemli oranda mortalite ve morbiditeden de sorumludur. Bu çalışmada, Sakarya bölgesinde 2013-2014 kış sezonunda akut solunum yolu semptomları olan hastalarda influenza virus tip A ve B sıklığı, hastaların solunumsal örneklerinden gerçek zamanlı (Rt)-PCR sistemi kullanılarak araştırılmıştır.

Etik Kurul onayı sonrası, Kasım 2013-Nisan 2014 dönemleri arasında Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma ve Korucuk Eğitim Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları, Göğüs Hastalıkları ve Pediatri kliniklerine son 48 saatte ortaya çıkan solunumsal yakınmalar ile başvuran ya da yoğun bakımda yatan toplam 95 hastadan alınan nazofarengeal sürüntü, balgam veya diğer solunum yolu örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerde influenza virus tip A ve B'ye ait nükleik asit varlığı ticari multipleks Rt-PCR yöntemi (Influenza Virus A, B Real-TM kit; Sacace, İtalya) ile araştırılmıştır. Hastaların yaşları 1 ay - 89 yıl arasında olup, 54'ü (%56.8) kadın, 41'i (%43.2) erkektir. Hastaların 83'ü (%87.4) mevsimsel grip aşısı yaptırmadıklarını ifade etmişlerdir. Çalışılan 95 örneğin 9'unda (%9.5) Rt-PCR yöntemi ile influenza virus pozitifliği saptanmış; bunların 5'inde influenza A (%3.3), 4'ünde (%2.6) influenza B varlığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, son yıllarda influenza virus tip B'nin de, hastalarda azımsanmayacak oranda pozitif saptandığı dikkati çekmektedir.

Anahtar sözcükler: İnfluenza virus A ve B, gerçek zamanlı PCR

PP - 141

Erzincan İlindeki Hemodiyaliz Hastalarında Hepatit B ve Hepatit C Sıklığı ile Aşılamanın Etkisi

Barış Gülhan¹, Aytekin Çıkman¹, Merve Aydın¹, Kültigin Türkmen²

¹Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan

²Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nefroloji Kliniği, Erzincan

Hemodiyaliz hastalarında hepatit B ve hepatit C'nin fazla görülmesinden dolayı korunmada azami titizlik gösterilmektedir. Erzincan ilindeki hemodiyaliz hastalarında hepatit B ve hepatit C'nin durumu hakkında çalışma bulunmamaktadır. Amacımız bu hasta grubunda moleküler tanı ile doğrulanan olgu oranlarının tespiti ile birlikte hepatit B'ye karşı aşılamanın etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmaya 2013 yılında Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde hemodiyaliz tedavisi alan 49 hasta dahil edilmiştir. Hemodiyaliz tedavisine karar verilen ve serolojik olarak hepatit B yönünden negatif olan hastalar aşılama programına alınmıştır. Hastaların HBsAg, anti-HBs ve anti-HCV testleri, kemilüminesans immünolojik yöntemiyle (Advia Centaur XP immunoassay system; Siemens, Almanya) çalışılmıştır. Doğrulama amacıyla, HBV-DNA (Bosphore HBV Quantification Kit v1, Anatolia Geneworks, İstanbul) ve HCV-RNA (Bosphore HCV Quantification Kit v1, Anatolia Geneworks, İstanbul) tespitinde gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların 3'ünde (%6.1) anti-HCV testi pozitif bulunmuştur. Bu hastaların birinde (%2) HCV-RNA saptanmıştır. Diğer iki hastada HCV-RNA bulunamamıştır. HBsAg pozitif bulunan üç

yükün kantitatif olarak belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Tanı Laboratuvarımızın bir yıllık HCV-RNA viral yük dağılım aralığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 1 Ocak 2013- 31 Aralık 2013 tarihleri arasında, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin çeşitli klinik bölümlerinden, HCV-RNA varlığı ve düzeyinin belirlenmesi için istem yapılan, yaşları 1-89 arasında değişen 477 hastaya ait toplam 639 serum örneği, Cobas/AmpliPrep/Cobas Taqman (Roche, ABD) ve HCV Quantification Kit v1, Magnesia 16 ve Montania 483 (Anatolia Geneworks, İstanbul) sistemleri ile gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılarak üretici firmaların önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

Bulgular: Çıkarılan 639 örneğin 422'si (%66) negatif, 217'si (%34) farklı titrelerde pozitif olarak değerlendirilmiştir. HCV-RNA test sonucu pozitif olan 68 hastaya ait toplam 217 serum örneğinin 3'ü (%1.4) 1-10², 6'sı (%2.8) 10²-10³, 7'si (%3.2) 10³-10⁴, 28'i (%12.9) 10⁴-10⁵, 97'si (%44.7) 10⁵-10⁶, 73'ü (%33.6) 10⁶-10⁷ ve 3'ü (%1.4) 10⁷-10⁸ IU/ml titrelerde pozitif olarak bulunmuştur.

Sonuç: Bölgemizdeki HCV-RNA pozitif örneklere ait viral yük miktarının 10⁴-10⁷ IU/ml titreleri arasında yoğunlaştığı gözlenmiştir. Bu titreler ile anti-HCV pozitifliği, serum transaminazları, yaş ve cinsiyet arasındaki ilişkinin irdelenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: HCV-RNA, gerçek zamanlı PCR

PP - 139

Antiviral Tedavi Almayan Düşük Risk Gruplarına Ait Serum Örneklerinden Elde Edilen anti-HCV, HCV-RNA ve HCV Genotiplendirme Sonuçlarının İncelenmesi

Cengiz Demir, Recep Keşli, Gülşah Aşık, Özlem Yoldaş, Özgül Çetinkaya

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

Amaç: Hepatit C virusu (HCV) %80-85 oranında kronikleşerek, siroz ve hepatoselüler karsinoma yol açması nedeniyle önem taşımaktadır. Enfeksiyonun tanısında, serolojik olarak anti-HCV ve vireminin tespiti için moleküler yöntemle HCV-RNA düzeyleri araştırılmaktadır. Bu çalışmada, antiviral tedavi almayan düşük risk gruplarına ait serum örneklerinden elde edilen anti-HCV, HCV-RNA ve HCV genotiplendirme sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, Ocak 2012-Mart 2014 tarihleri arasında gönderilen serum örnekleri değerlendirilmiştir. Hastalar retrospektif olarak HCV risk faktörleri açısından araştırılmış, risk öyküsü olmayan hastalara ait örnekler çalışma kapsamına alınmıştır. Örnekler eş zamanlı çalışılmış anti-HCV ve HCV-RNA değerleri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Anti-HCV ELISA yöntemiyle (Vitros ECiQ, Ortho Clinical Diagnostics, ABD) çalışılmıştır. HCV-RNA doğrulama testi olarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (Cobas Taqman48, Roche Diagnostic, İsviçre) yöntemi kullanılmıştır. Genotiplendirme ters hibridizasyon yöntemi ile yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya 12.769 serum örneği dahil edilmiştir. Anti-HCV pozitiflik oranı %2.9 (375/12769), HCV-RNA pozitiflik oranı ise %2.6 (337/12769) olarak saptanmıştır. Anti-HCV pozitiflikleri HCV-RNA ile beraber değerlendirildiğinde yalancı pozitiflik oranı %0.7 (n=86), gerçek pozitiflik oranı ise %1.9 (n=61) olarak tespit edilmiştir. HCV-RNA pozitif hastaların 43'ünde HCV genotip (Gt)leri belirlenmiş; örneklerin 38'inde Gt-1b, 2'sinde Gt-1a, 2'sinde Gt-4, 1'inde ise Gt-3 tespit edilmiştir.

Sonuç: Dünyada ve ülkemizde olduğu gibi çalışmamızda da genotip 1 en yaygın genotip olarak belirlenmiştir. Bölgemiz verilerini yansıtan bu çalışmada nadir görülen genotip 4'ün de saptanmış olması dikkate değer bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Genotip, hepatit C virus (HCV)

hastanın (%6.1) ikisinde HBV-DNA (%4.1) tespit edilmiştir. 44 hastada (%89.8) anti-HBs antikor cevabı geliştiği gözlenirken, bunların 7'sinde (%14.3) antikor titrelerinin bir yıllık sürede süratle düştüğü görülmüştür. HBsAg pozitif olan ve HBV-DNA bakılan 3 hastanın da içinde bulunduğu 5 hastada ise (%10.2) anti-HBs antikor düzeyi 10 mIU/mL'nin altında bulunmuştur.

Sonuç olarak, hemodiyaliz hastalarındaki hepatit B ve hepatit C oranları, yurdumuzdaki verilerle genel olarak uyumlu bulunmuştur. Aşı ile gelişen anti-HBs antikor cevabına bakıldığında ülkemizdeki oranlara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu tablo, hastaların düzenli takip edilmesi ve bağışıklanmasına bağlanmıştır. Hemodiyalize alınacak seronegatif hasta grubu için aşılama yeterli olmayıp, antikor titresinin de sıkı takibi gereklidir. Bu şekilde etkili korunma mümkün olacaktır.

Anahtar sözcükler: Hemodiyaliz, hepatit B ve C

PP - 142

Erzurum Bölgesinde Astrovirus Gastroenteritinin RT-PCR Yöntemi İle Gösterilmesi

Hakan Aydın¹, Osman Aktaş², Mehmet Özkan Timurkan¹

¹Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum

²Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum

Amaç: Akut gastroenteritler dünya çapında bir sağlık sorunu olup özellikle pediatrik olgularda ölümle sonuçlanabilmektedir. Viral akut gastroenterit etkenlerinden olan astroviruslar; *Astroviridae* ailesinde, küçük, zarfsız, pozitif polariteli ve tek zincirli RNA viruslarıdır. Genel olarak, memelileri enfekte eden Mamastroviruslar (MAstVs) ve kanatlıları enfekte eden Avastroviruslar (AAstVs) olmak üzere iki cins içerisinde sınıflandırılırlar. Yetişkin ve çocuklarda ishal ve ateşle karakterize gastroenterit oluşabilmeyle birlikte, immün sistemi bakılanmış ve 4 yaş altı çocuklarda astroviral enfeksiyonlara daha sık rastlanmaktadır. Zoonoz karakterli olan astrovirusun, hayvancılığın yoğun bir şekilde yapıldığı bölgemizdeki varlığının ve moleküler prevalansının ortaya konulması amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Erzurum Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi ve Bölge Eğitim Araştırma Hastanesine Ocak 2012 ve Aralık 2013 tarihleri arasında kusma ve ishal şikâyetiyle başvuran 0-5 yaş arası 375 çocuk çalışmaya dâhil edilmiştir. Alınan gaita örneklerinden nükleik asit izolasyonu için QIASymphony®SP (Qiagen, Almanya) ekstraksiyon cihazı ve sarf malzemeleri kullanılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinden ters transkriptaz PCR (RT-PCR) ve ardından özgün primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Amplikonlar jel elektroforeze tabi tutulmuş ve 409 baz çifti uzunluğundaki bantlar astrovirus yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: 0-5 yaş arası 222 erkek (%59.2) ve 153 kız (%40.8) olmak üzere toplam 375 çocuktan alınan gaita örneklerinden 21'i (%5.6) astrovirus yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif olguların 9'u (%42.9) erkek, 12'si (%57.1) ise kız çocuklardır.

Sonuç: Bölgemizde astrovirus kaynaklı gastroenterit olgularına yönelik moleküler tabanlı ilk verileri sunması nedeniyle önemli olduğunu düşündüğümüz bu çalışmada, %5.6 oranında astrovirus ile gelişen gastroenteritlerin yadsınamayacak öneme sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Akut gastroenterit, astrovirus

PP - 143

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında Torque Teno Virus Varlığı

Bahadır Feyzioğlu¹, Turgut Teke², Mehmet Özdemir¹, Metin Doğan¹, Mehmet Yavşan²

¹Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

²Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya

Amaç: *Anelloviridae* ailesinde sınıflandırılan, çıplak, ikozahedral yapılı, çembersel tek iplikli bir DNA virusu olan Torque Teno virus (TTV), insanlarda ilk olarak, transfüzyon ile bulaşan virus olarak tanımlanmıştır. TTV viremi dünya çapında yaygın olmasına rağmen, belirli klinik tablolarla TTV enfeksiyonu arasında doğrudan nedensel bir ilişki tam olarak ispat edilememiştir. Bu araştırmanın amacı, TTV'nin kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH)'nda bir rolü olabileceğine yönelik ipuçlarına ulaşabilmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 57 KOAH'lı hasta ve kontrol grubu olarak 39 gönüllü kan bağışçısından elde edilen serum örnekleri dahil edilmiştir. KOAH hastaları; alevlenme nedeniyle non-invazif ventilasyon gerekli hastalar (n: 20), sadece tıbbi tedavinin gerekli olduğu hastalar (n: 19) ve polikliniğe kontrol için davet edilen hastalar (n: 18) olmak üzere üç gruptan oluşmuştur. TTV-DNA tayini hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirilmiş ve viral yük CP (crossing point) değerleri ile yorumlanmıştır.

Bulgular: TTV-DNA, hem hasta ve hem de kontrol gruplarında tespit edilmiştir. Prevalans, ayaktan kontrol hastaları, sadece tıbbi tedavi alan hastalar ve alevlenme nedeniyle non-invazif ventilasyon alan hastalarda sırasıyla %94.4, %94.7 ve %100 olarak belirlenirken, kontrol grubunda %84.6 oranında TTV-DNA varlığı gösterilmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hasta gruplarının tamamında CP değerlerinin, istatistiksel olarak kontrol grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: TTV-DNA prevalansı, hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında farklılık göstermektedir. Viral yükün en yüksek olduğu grup, alevlenme nedeniyle non-invazif ventilasyon alan hastalardır. Bu durum, TTV'nin KOAH gelişimi ve şiddeti ile ilişkili olabileceğini düşündürmekle birlikte, daha ileri klinik çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, Torque Teno virus

PP - 144

pkSL 1 Genine Özgül PCR Yöntemi ile Aflatoksikojenik *Aspergillus flavus* Türlerinin Tespiti

Zülal Kesmen¹, Ahmet Evren Yetiman¹, Ayten Güllüce², Hakiye Arslan³

¹Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Kayseri

²Cumhuriyet Üniversitesi Gemerek Meslek Yüksekokulu, Sivas

³Bingöl Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bingöl

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsi küfler tarafından üretilen potansiyel karsinojenik, mutajenik ve teratojenik metabolitlerdir. *Aspergillus flavus* en yaygın aflatoksin üreticisi küf olarak tanımlanmakla birlikte, bu türe ait suşların ancak %40-50'sinin aflatoksijenik olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle tarımsal ürünlerde aflatoksin oluşma riskinin belirlenmesi ve önlem alınmasında aflatoksikojenik *A. flavus* suşlarının hassas ve güvenilir yöntemlerle tanımlanması oldukça önemli görülmektedir. Günümüzde aflatoksin üretiminin biyosentez yolu ve bu yoldaki yapısal ve düzenleyici genler, aflatoksin üreten suşların tanımlanması ve aflatoksin biyosentezinin moleküler düzeyde incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da aflatoksin biyosentezinden sorumlu yapısal genlerden poliketide sentaz (*pkSL 1*) geni üzerinde yaklaşık 400 baz çiftlik bölgeyi amplifiye eden özgül bir primer seti dizayn edilmiştir. Çalışmamızda dizayn edilen primer seti kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında, 13 *Aspergillus flavus* standart NRRL

suşu ve farklı ürünlerden izole edilmiş 66 *A. flavus* izolatu analiz edilmiştir. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi sonucunda, aflatoksin üreten suşların tamamının pozitif, üretmeyenlerin tamamının ise negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Ayrıca yöntemin başarısı, aflatoksin biyosentez metabolik yolunun düzenleyici geni, *afR*'ye özgül primerlerle de karşılaştırılmış ve analiz edilen tüm standart suşlar ve izolatlarda paralel sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında dizayn edilen *pksL 1* genine özgül primer seti kullanılarak gerçekleştirilen PCR yönteminin, aflotoksijenik *A. flavus* türlerinin özgül olarak tespitinde ve aflatoksin biyosentez mekanizmasını aydınlatılmasında başarılı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Aspergillus flavus*, *pksL 1* geni

PP - 145

Klinik Örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksin Moleküler Tanısında BD ProbeTec ET Sisteminin Değerlendirilmesi

Can Biçmen¹, Onur Karaman², Ayрыз Tuba Gündüz¹, Meral Coşkun¹, Osman Kaftan¹, Mahmut Mete Demirel¹, Güneş Şenol¹, Tülay Akarca², Şevket Dereli², Ayşe Özsoz²

¹Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi EAH, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

²Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi EAH, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Servisi, İzmir

Amaç: Bu çalışmada, klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC)'in moleküler tanısında, *Strand Displacement Amplification* (SDA) temelli BD ProbeTec ET (BD Diagnostic Systems, MD) sisteminin tanısal performansının, beş yıllık laboratuvar ve klinik veriler doğrultusunda irdelenerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Kasım 2008 - Kasım 2013 tarihleri arasında hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarına kabul edilen kuşku tüberküloz ön tanısı olan 4.304 hastaya ait 4.883 örnek [4.716 solunum yolu (4.626 bronş aspirasyon, 90 balgam) ve 167 solunum yolu dışı] çalışmaya alınmıştır. Her örnek için, asido-rezistan boyama ve BACTEC 460 veya 960 (MGIT) (BD Diagnostic Systems, MD) sisteminde ve Löwenstein-Jensen besiyerinde kültür yapılmıştır. Hasta örneklerinde MTC moleküler tanısı için BD ProbeTec ET sistemi üretici firma önerileri doğrultusunda kullanılmış ve sonuçlar kültür ve/veya klinik verilerle birlikte değerlendirilmiştir.

Bulgular: Tüm örnekler için, duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla; %82.1, %98.2, %83.8 ve %97.9 olarak bulunmuştur. Bu değerler, solunum yolu örnekleri için, %81.8, %98.3, %85.1 ve %97.9; solunum yolu dışı örnekler için ise %100, %94.3, %47.1 ve %100 olarak hesaplanmıştır. Tüm örnekler içerisinde, 4.784 örnek (%98) yayma olumsuz ve 99 örnek (%2) yayma olumlu olarak saptanmıştır. Yayma olumsuz örnekler için ise, tanısal performans değerleri, sırasıyla, %78.7, %98.2, %80 ve %98 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Genel olarak, BD ProbeTec sistemi için yüksek özgüllük değerleri bulunmasına karşın, duyarlılık ve pozitif prediktif değerler daha düşük olarak saptanmıştır. Tüberkülozun erken tanısı için, BD ProbeTec, kullanışlı ve kolay uygulanabilir olmakla birlikte, daha iyi bir tanısal performans için daha yüksek duyarlılık ve pozitif prediktif değerleri olan yeni versiyonlara gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar sözcükler: BD ProbeTec ET, tüberküloz

PP - 146 NUMARALI BİLDİRİ İPTAL EDİLMİŞTİR.

PP - 147

Klinik Örneklerde Tüberküloz Dışı (Atipik) Mikobakterilerin Araştırılması: Retrospektif Değerlendirme (2009-2014)

Can Biçmen¹, Ayрыз Tuba Gündüz¹, Meral Coşkun¹, Osman Kaftan¹, Mahmut Mete Demirel¹, Güneş Şenol¹, Onur Karaman², Tülay Akarca², Şevket Dereli²

¹Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi EAH, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

²Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi EAH, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Servisi, İzmir

Amaç: Bu çalışmada, tüberküloz ön tanılı hastalardan alınan örneklerde tüberküloz dışı (atipik) mikobakterilerin sıklığının ve soyutlanan mikobakteri türlerinin yıllara göre dağılımının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, Ocak 2009 - Mayıs 2014 tarihleri arasında ait 54.991 hastaya ait 59.991 örnek değerlendirilmiştir. Örneklerin, ön işleme sonrası BACTEC 460 veya 960 (MGIT, BD, ABD) sisteminde ve Löwenstein-Jensen besiyerinde kültürü yapılmıştır. Üreme saptanan örneklerde, tüberküloz dışı mikobakteri ayırımı, geleneksel yöntemler ve BACTEC 460 NAP testi veya BD immüno-kromatografik test ile yapılmıştır. Mikobakteri tür tanımlaması GenoType Mycobacterium CM/AS kiti (Hain Lifescience, Almanya) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, 3.325 hastaya (%9.8) ait 7.325 örnekte (%13.3) asidorezistan basil üremesi saptanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) varlığı, 221 (%0.65) hastadan alınan 534 (%0.97) örnekte tespit edilmiştir. Üreme saptanan örnekler içerisinde TDM oranı %7.3 olarak bulunmuştur. Klinik olarak TDM enfeksiyonu olabileceği düşünülen 70 hastada, *M.intracellulare* (n=15), *M.abscessus* (n=12), *M.simiae* (n=12), *M.avium* (n=10), *M.kansasii* (n=9), *M.gordonae* (n=6), *M.fortuitum-peregrinum* kompleks (n=2), *M.malmoense/haemophilus* (n=1) ve *M.lentiflavum* (n=1) türleri tanımlanmış; 2 örnekte ise mikobakteri türü tanımlanamamıştır. Atipik mikobakteri üremesinin hastalık etkeni olarak değerlendirildiği 59 hasta, TDM enfeksiyonu yönünden takip edilmiş ve/veya tedavi uygulanmıştır. Onbir hastada ise üremeler kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Hastanemizde, 2004-2009 yılları ile karşılaştırıldığında, önceki yıllarla uyumlu olarak atipik mikobakteri enfeksiyon sıklığının düşük olduğu ve tanımlanan türler içerisinde *M.simiae*'nin önceki yıllara göre daha fazla oranda saptandığı gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Tüberküloz dışı mikobakteri, tanımlama

PP - 148

Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde Vankomisine Dirençli Enterokoklara Bağlı Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonların Analizi

Suna Kızılyıldırım, Fatih Köksal, Tülin Güven Gökmen, Cansu Önen, Melda Meral, Yıldız Kalaycı, Ömer Okuyan

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

Giriş: Vankomisine dirençli enterokok (VRE)'ler, sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon (SHİE)'lerin en önemli etkenlerinden biridir. Aktif enfeksiyonlu hastalar kadar kolonize olan hastalar da, VRE'lerin yayılımında önemli bir kaynaktır. Bu kişiler, VRE otoinokülasyon enfeksiyonu riski taşıdıkları gibi; tıbbi cihazların, sağlık çalışanlarının ve diğer hastaların da kolonize olmasına yol açarlar. Sağlık personeli, hasta/hasta yakınlarının eğitimi, akılcı antibiyotik kullanımı ve surveians çalışmaları ile SHİE'lerin tamamen ortadan kaldırılması (prevalansın %0'a çekilmesi) hedeflenmektedir. Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi (ÇYBÜ)'nde yatan hastalardan izole edilen enterokok suşlarının klinik ve klonal ilişkisi SHİE'lar yönünden irdelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Yoğun bakım ünitesinde 19.01.2010-09.01.2012 tarihleri arasında en az 7 gün izlenen 82 hastadan alınan göbek,

kulak ve rektal sürüntü (RS) örneklerinden izole edilen 49 enterokok suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

Bulgular: Vankomisine duyarlı enterokok (VSE) ve VRE suşlarının asemptomatik taşıyıcılıkları ve hastane kökenli bulaş risklerini tespit amacıyla planlanan bu çalışmada, 14'ü VRE olmak üzere toplam 49 enterokok suşu izole edilmiştir. Çalışma süresince hastaların hiçbirinde enterokok enfeksiyonu kaydedilmemiştir. Kolonize hastalardan izole edilen 49 izolatin PFGE yöntemiyle yapılan analizinde; rektal kökenli VRE-*E.faecium* suşlarının %85.7 oranında ilişkili olduğu, VSE-*E.faecium* suşlarında tespit edilen en yakın ilişkinin %92.3 ile aynı hastaya ait göbek ve kulak izolatlarına ait olduğu, VSE-*E.faecalis* suşlarından aynı hastaya ait göbek ve RS örneklerinin %100, VSE-*E.gallinarum* suşlarından ise farklı hastalara ait göbek ve RS örneklerinin %94.7 oranında ilişkili olduğu görülmüştür. **Sonuç:** SHİE'ları yönünden bilgilendirme ve izlem çalışmalarının 1998 yılından itibaren yapıldığı, suşların klonal düzeyde izlendiği hastanemizde, yüksek riskli ÇYBÜ'nde kolonizasyonu olan hastaya rağmen VRE ile ilişkili enfeksiyonun görülmemiş olması %0 hedefinin yakalanabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Vankomisine dirençli enterokok, PFGE

PP - 149

Bruselloz Tanısında Brucellacapt ve ODAK Brucella Coombs Jel Testi Kitlerinin Tanısal Performanslarının Karşılaştırılması

Onur Karatuna¹, Işın Akyar¹, Merve Sakarya Uyanık², Tanıl Kocagöz¹

¹Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarları, İstanbul

Amaç: Çalışmamızda Coombs antikoru içeren bir sistemi olan Brucellacapt (Vircell, İspanya) ile yerli bir üretici tarafından geliştirilen, jel matris ve Coombs antikoru içeren kuyucuklarda santrifüjasyon yardımıyla antijen-antikor kompleksi varlığını gösteren ODAK Brucella Coombs Jel Testi (İSLAB, Türkiye) kitlerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, bruselloz ön tanılı hastalardan alınan 286 serum örneği dahil edilmiştir. Örnekler; Rose Bengal (RB) testi, 1/40-1/5120 sulandırım aralığında standart tüp aglütinasyon (STA) testi (Seromed, Türkiye), Brucellacapt ve ODAK testleriyle çalışılmıştır. STA ile aglütinasyon gözlenmeyen tüplere Coombs antikoru eklenerek Coombs'lu tüp aglütinasyon (Coombs'lu TA) testi uygulanmıştır.

Bulgular: RB testiyle örneklerin 145'i (%50.7) negatif, 141'i (%49.3) pozitif bulunmuştur. 1/160'ın altındaki değerler negatif kabul edildiğinde, negatif RB test sonucuna sahip 145 örneğin 144'ü (%99.3) STA, 142'si (%97.9) Coombs'lu TA, 138'i (%95.2) Brucellacapt ve 141'i (%97.2) ODAK test sonuçlarına göre negatif bulunmuştur. RB testi ile pozitif olan 141 örneğin 94'ü (%66.7) STA, 112'si (%79.4) Coombs'lu TA, 120'si (%85.1) Brucellacapt ve 114'ü (%80.9) ODAK kiti ile pozitif bulunmuştur (Tablo I). Coombs'lu TA test sonuçları +/- 1 seyreltim sınırlarında Brucellacapt ve ODAK kitleri ile elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında, genel uyum her iki kit ile çok benzer bulunmuş (sırasıyla; %93.7, %93.4), <1/160 titrelerde ODAK kiti yüksek uyum gösterirken (%97.1), 1/160 ve üzeri titrelerde Brucellacapt kiti yüksek uyum göstermiştir (%95.7) (Tablo II).

Sonuç: Çalışmamız negatif RB testi sonuçlarının güvenilir olduğunu, ancak pozitif RB sonuçlarının klinik öneminin belirlenmesinde Coombs antikoru içeren bir yöntemle doğrulanması gerektiğini göstermiştir. Brucellacapt ve ODAK kitleri arasında tanı performansı açısından belirgin bir fark gözlenmemiştir. ODAK test sonuçlarının 24 yerine 2 saatte sonuç vermesi ve sonuçların kolay değerlendirilmesi avantajlı olabilir.

Anahtar sözcükler: Brucellacapt, ODAK Brucella Coombs Jel Testi

Tablo I. Çalışma serumlarının (n=286) bruselloz tanısında kullanılan çeşitli testlerle verdiği sonuçlar

Rose Bengal		STA	Coombs'lu TA	Brucellacapt	ODAK
Negatif n = 145	Negatif	139	135	100	125
	1/40	4	5	33	13
	1/80	1	2	5	3
	1/160	0	1	5	0
	1/320	1	1	0	1
Pozitif n = 141	1/640	0	1	2	3
	Negatif	20	8	0	6
	1/40	12	11	9	10
	1/80	15	10	12	11
	1/160	16	18	15	16
	1/320	21	24	25	26
	1/640	17	15	24	18
	1/1280	10	14	14	20
	1/2560	9	13	14	11
	≥ 1/5120	21	28	28	23

STA: Standart tüp aglütinasyon, Coombs'lu TA: Coombs'lu tüp aglütinasyon

Tablo II. Coombs'lu TA testi ile elde edilen sonuçların, ±1 dilüsyon sınırlarında Brucellacapt ve ODAK test sonuçları ile uyumu

Coombs'lu Tüp Aglütinasyon	n	± 1 dilüsyon ile uyum			
		Brucellacapt		ODAK	
	n	n	%	n	%
Negatif	143	137	95,8	142	99,3
1/40	16	13	81,3	14	87,5
1/80	12	8	66,7	10	83,3
1/160	19	16	84,2	14	73,7
1/320	25	23	92,0	24	96,0
1/640	16	16	100,0	15	93,8
1/1280	14	14	100,0	11	78,6
1/2560	13	13	100,0	12	92,3
≥ 1/5120	28	28	100,0	25	89,3
Genel	286	268	93,7	267	93,4

PP - 150

Acinetobacter baumannii Suşlarında Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim Sıklığı

Ali Rıza Atasoy¹, Mustafa Petek², İhsan Hakkı Çiftçi¹

¹Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

²Fatih Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul

Acinetobacter izolatlarında aminoglikozid direncinden, çoğunlukla aminoglikozidlerin enzimatik modifikasyonuna neden olan nükleotidiltransferazlar, asetiltransferazlar ve fosfotransferazlar sorumludur. Çalışmamızda aminoglikozid direnci ve aminoglikozid modifiye edici enzim arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bu çalışmada değişik kliniklerden izole edilen toplam 32 *A.baumannii* suşu kullanılmış, bu suşlar gentamisin, imipenem ve meropenem direnç/duyarlılık verilerine göre 4 gruba ayrılmıştır. Suşların tanımlama ve duyarlılık çalışmaları Vitek2 otomatize sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Aminoglikozid modifiye edici enzimlerin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Tüm suşlarda aminoglikozid direncinden sorumlu 7 enzim; aph(3')-VI, aph(3')-Ia, aac(3)-Ia, aac(3)IIa, aac(6)-Ih, aac(6)-Ib ve ant(2'')-Ia araştırılmıştır.

Çalışmamızda 19 suşta (%57.6) asetiltransferaz, 12 suşta (%36.4) fosfotransferaz ve 2 suşta (%6.1) nükleotidiltransferaz varlığı bulunmuştur. Çalışmalar sonucunda 16 suşta (%48.5) aac(3)-Ia, 11 suşta (%33.3) aph(3')-Ia, 2 suşta (%6.1) ant2-Ia ve aac(6)-Ib, 1 suşta (%3) aac(6)-Ih ve aph(3)_VI enzimleri saptanmıştır. Aac(3)-Ia

enzimleri hiç bir suşta tespit edilememiştir. İncelenen, 17 gentamisine dirençli ve 3 amikasin dirençli suşta 15 aac(3)_Ia (%50), 10 aph(3)_Ia (%33,3), 2 aac(6)_Ib (%6.7), 2 ant2_Ia (%6.7), 1 aac(3)_Ih ve aph(3)_VI (%3.3) pozitifliği gösterilmiştir.

Son yıllarda, *A.baumannii* kaynaklı enfeksiyonların kombine tedavilerinde kullanılan aminoglikozitlere karşı direnç dikkate değer oranda artmıştır. *A.baumannii* klinik izolatlarıyla yapılan bu ilk çalışmada, aminoglikozid direncinin daha çok asetiltransferaz ve fosfotransferaz enzimleri kaynaklı olabileceği ortaya konmuş, ancak bu verilerin, ülkemizin farklı bölgelerinden daha geniş sayıda izolatlarla yapılacak olan çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca tek başına enzim varlığı direncin açıklanmasında yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden direncin oluşmasında enzim varlığına eşlik eden bileşenlerin de ortaya konması yararlı olacaktır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, aminoglikozid direnç

PP - 151

Rotavirus Varlığında Bazı Bifidobakteri Türlerinde Ekzopolisakkarit Üretimi, Kolesterol Taşınımı ve Safra Tuzu Dekonjugasyon Yeteneğinin Araştırılması

Gülçin Alp Avcı¹, Şule Pakso²

¹Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Çorum
²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

Rotavirus, özellikle 0-5 yaş arası çocuklarda görülen önemli bir gastroenterit etkenidir. Aynı zamanda, dünya genelinde yapılan çalışmalar bu yaş grubunda probiyotik mikroorganizmaların önemini vurgulamaktadır. Özellikle bifidobakteriler bazı probiyotik özelliklerinden dolayı bağırsak florasının düzenlenmesinde ve patojen mikroorganizmaların engellenmesinde önemli role sahiptir. Bu nedenle çalışmamızda, rotavirus ile enfekte çocuklardan izole edilen bazı bifidobakteri türlerinde ekzopolisakkarit üretimi, kolesterol taşınımı ve safra tuzu dekonjugasyon yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, ELISA yöntemi ile rotavirus varlığı tespit edilen 2 ay - 5 yaş arası toplam 35 (12 kız, 23 erkek) olgu dahil edilmiştir. Olgulardan toplanan dışkı örneklerinde bifidobakterilerin belirlenmesi için klasik tanımlama yöntemleri kullanılmıştır. Ekzopolisakkarit üretimi en yüksek ve en düşük olan 4 suşun kolesterol taşınımı ve safra tuzu dekonjugasyon yeteneği belirlenmiştir. Suşların dekonjugasyon yeteneği, konjuge safra tuzlarının dekonjugasyonundan kaynaklanan kolik asidin serbest bırakılması ile belirlenmiştir.

Probiyotik mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, bifidobakterilerin ekzopolisakkarit üretimi, kolesterol taşınımı ve safra tuzu dekonjugasyon yeteneği gibi bazı probiyotik özelliklerinin oldukça iyi olduğu gözlenmektedir. Ancak, yapılan çalışmalarda sağlıklı olgulardan izole edilen bifidobakterilerin probiyotik özelliklerinin belirlenmiş olması dikkat çekmektedir. Yaptığımız çalışmada izole edilen bifidobakterilerin rotavirus ile enfekte olgulardan elde edilmesi sebebiyle, araştırılan özelliklerin literatürlerde gözlenen değerlerden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, ülkemizde ve tüm dünyada artan rotavirus olguları ve tedavi yöntemleri dikkate alındığında, hem bağırsak fonksiyonları hem de yaşamsal faaliyetler açısından olumlu etkileri belirlenen probiyotik mikroorganizmaların rotavirus ile enfekte çocukların diyetlerine eklenmesi oldukça önemlidir.

Anahtar sözcükler: Bifidobakteri, rotavirus

PP - 152

Farklı *Zingiber officinale* (Zencefil) Ekstraktlarının Anti-Adhezyon Etkisinin Belirlenmesi

Kübra Erkan¹, Solmaz Mosayyebi², Demet Erdönmez¹, Necdet Sağlam², Nilüfer Aksöz³

¹Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

Üst solunum yolu enfeksiyonlarından sonra, milyonlarca insanı etkileyen idrar yolu enfeksiyonları önemli bir sağlık sorun haline gelmiştir. Bu enfeksiyonun immün sistemi baskılanmış kişilerde, erkeklere kıyasla kadınlarda, tuvalet hijyeninin sağlanmadığı durumlarda sıklıkla görülmektedir. Enfeksiyon oluşumunun ilk aşaması, patojen mikroorganizmanın yüzeye tutunması, yani adhezyondur. Tutunma (adhezyon) ile birlikte önemli virülans faktörlerden biri olan biyofilm oluşumu gözlenmektedir. Bu çalışmada, önemli üropatojenler olan *E.coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Enterobacter* spp. klinik izolatlarında, zencefil (*Zingiber officinale*) bitkisinin kloroform, dimetilsülfoksit (DMSO) ve aseton ekstraktlarının, adhezyon ve biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya alınan izolatlar, TSB (Triptik Soy Broth) besiyerine McFarland 0.5'e göre hazırlanan konsantrasyonlarda inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Antibiyofilm çalışmaları, 24 kuyucuklu polistren plaklarda gerçekleştirilmiştir. Zencefil bitkisinin anti-biyofilm potansiyeli ışık mikroskobu ve spektroskopik yöntemle incelenmiştir. Anti-adhezyon aktivitesi için MTT Assay Kiti (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Ayrıca zencefil ekstraktları ile muamele edildiğinde, bu mikroorganizmaların ekzopolisakkarit üretimi, hareket yetenekleri, aljinat üretimi gibi virülans özelliklerinde azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, zencefil bitkisi ekstraktlarının üropatojenlerin tedavisinde, antibiyotiklerin etkisini artırıcı yönde katkı sağlayan madde olarak kullanılabilirliği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Zencefil ekstraktı, anti-adhezyon etki

PP - 153

Yunus Emre Devlet Hastanesinde Altı Yıllık Süre İçinde Üriner Enfeksiyonlardan İzole Edilen Bakteriler ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

Hakkı Mustafa Güldüren, Figen Çağlan Çevik, Nevil Aykın, Pınar Korkmaz, Yeşim Alpay, Melahat Uğur, Zühre Doğru Yaşar

Yunus Emre Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Eskişehir

Amaç: Kateter ile ilişkili üriner sistem enfeksiyonları (Kİ-ÜSE), en sık karşılaşılan hastane enfeksiyonlarıdır. Hastaneye yatan hastalarda üriner kateterler %15-25 oranında kullanılmakta, bu oran yoğun bakım hastalarında %75-90'lara kadar ulaşmaktadır. Bu çalışmada, hastanemizde hastane enfeksiyonu sürveyansı yapılan klinik ve yoğun bakım ünitelerinde saptanan Kİ-ÜSE'nde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 2008-2013 tarihleri arasındaki Kİ-ÜSE olguları retrospektif olarak incelenmiştir. Üreyen mikroorganizmaların tanımlanması ve antibiyogramları VİTEK-2 (bioMérieux, ABD) yöntemi ile yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda toplam 437 kültür değerlendirilmiştir. Üreyen mikroorganizmalar; *E.coli* (n: 110; %25.2), *Pseudomonas aeruginosa* (n: 84; %19.2), *Candida* spp. (n: 66; %5.1), *Enterococcus* spp. (n: 54; %12.4), *Acinetobacter baumannii* (n:33; %7.6), *Klebsiella* spp. (n: 31; %7.1), *Enterobacter* spp. (n: 7; %1.6), koagülaz negatif stafilokoklar (n: 6; %1.4), *Proteus* (n: 5; %1.1), metisiline dirençli *S.aureus* (n: 3; %0.7), metisiline duyarlı *S.aureus* (n:2; %0.5), *Serratia* (n: 2;

%0.5) ve *Streptococcus* spp. (n: 1; %0.2) olarak tespit edilmiştir. Gram-negatif izolatların 72'si (%16.5) ESBL pozitif, 66'sı (%15.1) ESBL negatif olarak bulunmuştur. İzolatların antibiyotik duyarlılık oranları tabloda gösterilmiştir.

Sonuç: Kİ-ÜSE'nda etken mikroorganizmaların değerlendirilmesi, antibiyotik duyarlılık ve direnç paternlerinin irdelenmesinin, doğru "antibiyotik kontrol politikaları" üretilmesi ve "akılcı antibiyotik kullanımı" uygulamasında önemli rolü olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Üriner enfeksiyon, antibiyotik duyarlılığı

Tablo. Kİ-ÜSE olgularından izole edilen mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık oranları (%)

	AMP	GEN	AK	AMC	CXM	CRO	CIP	İM	SXT	FF	NF	SCF	TPZ	TİG	KOL	ERT	LİN	TEC	FLU	CF
<i>E.coli</i>	65	60	92	28	34	36	40	97	46	96	85	73	73	92	100	89	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.	-	50	96	28	12.5	13	40	91	37	72	59	63	47	75	100	88	-	-	-	-
<i>Paeruginosa</i>	33	55	80	2	-	3	51	77	11	40	13	65	74	17	56	-	-	-	-	
<i>A.baumannii</i>	-	45	53	7.6	13	16	21	27	38	-	-	46	17	85	93	-	-	-	-	
<i>Enterococcus</i> spp.	19	14	-	71	-	-	17	43	10	-	58	50	-	100	-	-	95	87	-	
<i>Candida</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100

AMP: Ampisilin; GEN: Gentamisin; AK: Amikasin; AMC: Amoksisilin-klavulanat; CXM: Sefuroksim; CRO: Seftriakson; CIP: Siprofloksasin; İM: İmipenem; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; FF: Fosfomisin; NF: Nitrofurantoin; SCF: Sefoperazon-sulbaktam; TPZ: Piperasilin/tazobaktam; TİG: Tigesiklin; KOL: Kolistin; ERT: Ertapenem; LİN: Linezolid; TEC: Teikoplanin; FLU: Flukonazol; CF: Kaspopungin.

PP - 154

Zingiber officinale (Zencefil) Bitkisinin Metanol Ekstraktının Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi

Demet Erdönmez¹, Kübra Erkan¹, Solmaz Mosayyebi², Nilüfer Aksöz³, Necdet Sağlam²

¹Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

Üropatojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlarda, *quorum sensing* (QS) sistemi önemli rol oynamaktadır. Bu patojenlerin virülans faktörleri QS sistemi ile düzenlenmektedir. Bu araştırmada, *Zingiber officinale* (zencefil)'in metanol, kloroform ve metanol+kloroform ekstraktlarının anti-QS aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Anti-QS aktivitesini belirlemek için gram-negatif bakterilerde iletişim molekülü olarak kullanılan *N-hexanoyl-L-homoserine lactone* (C6-HSL) molekülünün inhibisyonuna bakılmıştır. Çalışmamızda *Chromobacterium violaceum* CV026 (Biyosensör suş), *Chromobacterium violaceum* 12472 (wildtype), *Chromobacterium violaceum* 31532 [AHL (N-acyl-homoserine lactone) üretici] bakteri suşları anti-QS aktivite çalışmasında "reporter" suşlar olarak kullanılmıştır. *Z.officinale*'in etkisini saptamak için agar difüzyon testi uygulanmıştır. Aynı zamanda viyolasin pigmenti miktarı da ölçülmüştür. Çalışmamızda, *Z.officinale* ekstraktlarının bakteriyel iletişim molekülü olan C6-HSL üzerinde inhibitör bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda antibiyotik direncinin sık görüldüğü üropatojen enfeksiyonlarında alternatif bir tedavi uygulaması olarak değerlendirilebileceği ya da ilaç katkısı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Anti-quorum sensing, *N-hexanoyl-L-homoserine lactone* (C6-HSL)

PP - 155

Akut Solunum Yolu Enfeksiyonlarında Viral ve Bakteriyel Etkenlerin Multipleks PCR Yöntemi ile Araştırılması

Duygu Fındık, Tuba Seyhan, Hatice Türk Dağı, Uğur Arslan

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

Akut solunum yolu enfeksiyonları tüm dünyada en önemli morbidite ve mortalite nedenlerindedir. Bu çalışmanın amacı, akut solunum yolu enfeksiyonu ön tanısı olan hastalarda viral ve bakteriyel etkenlerin multipleks PCR yöntemiyle araştırılmasıdır.

Çalışmada, son bir yılda hastanemize başvuran ve akut solunum yolu enfeksiyonu ön tanısı alan 204'ü çocuk olmak üzere toplam 291 hastanın verileri retrospektif olarak incelenmiştir. Hastalardan nazofarengeal sürüntü örnekleri alınmış ve multipleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile çalışılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların %79.7'sinde (232/291) en az bir etken saptanmış; 156 (%67.2) hastada ise koenfeksiyon varlığı belirlenmiştir. Pozitif örneklerin %31.9'unda solunum sinsityal virusu (RSV) A/B, %25.4'ünde *Streptococcus pneumoniae*, %21.1'inde sitomegalovirus, %15.5'inde rinovirus, %13.4'ünde *Haemophilus influenzae*, %12.9'unda *Moraxella catarrhalis*, %8.6'sında insan metapnömovirusu A/B, %12.5'inde influenza virus tip A, B ve C, %7.8'inde koronavirüsler, %6.5'inde parainfluenza virus 2, 3 ve 4, %5.6'sında *Staphylococcus aureus*, %2.2'sinde adenovirus, %0.9'unda *Chlamydia pneumoniae*, enterovirus, *Legionella* spp., parechovirus ve %0.4'ünde bokavirus ile *Mycoplasma pneumoniae* tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, hastanemizde akut solunum yolu enfeksiyonlarında viral patojenlerden en sık RSV'nin, bakteriyel patojenlerden en sık *S.pneumoniae*'nin etken olduğu görülmüştür. Solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan patojenlerin hızlı ve duyarlı tanısı, etkene yönelik tedavinin planlanması ve olası hastane enfeksiyonlarının önlenmesi açısından gereklidir.

Anahtar sözcükler: Akut solunum yolu enfeksiyonu, multipleks PCR

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

Yazar İndeksi

- A**
- Abacioğlu, Hakan 6
 Abay, Seçil 108, 115, 116
 Abiha, Gül Bayram 97, 102
 Abudalal, Aman 131
 Acar, Osman 93
 Acar, Sümeýra 62, 102, 139
 Açıköz, Ziya Cibali 97, 134, 137
 Afşar, İlhan 128, 136
 Afşar, Yusuf 120, 123, 124, 138
 Ağca, Harun 124, 139
 Ahmed, Kamruddin 86
 Akalın, Halis 110
 Akan, Mehmet 60, 94, 104, 131
 Akarca, Meral 129
 Akarca, Tülay 143
 Akay, Meltem Olga 126
 Akbaş, Fahri 121, 122
 Akçay, Arzu 87
 Akçimen, Beril 118
 Akdağlı, Sevtap Arıkan 125
 Akdoğan, Fatma Nur 102
 Akgül, Öncü 116
 Akgün, Sadık 140
 Akkaya, Oya 130
 Akkaya, Yüksel 93
 Akoğlu, Musa 137
 Akova, Murat 112
 Aksöz, Nilüfer 145, 146
 Aksöz, Selçuk 140
 Aksu, Burak 100
 Aksu, Neriman 96
 Akşit, Filiz 126
 Aktaş, Osman 133, 142
 Akyar, Işın 48, 88, 108, 144
 Alanbayı, Ümit 101, 109, 110
 Alan, Yusuf 100
 Alay, İsmail Muaz 88
 Albay, Ali 96
 Albayrak, Hülya 124
 Albayrak, Nurhan 117
 Al, Funda Doğruman 127, 138
 Alp, Alpaslan 131
 Alpay, Yeşim 145
 Alp, Şehnaz Özyavuz 99, 102
 Altay, Aylin 86, 137
 Altındış, Mustafa 120, 139, 141
 Altun, Hatice Uludağ 91
 Andaç, Ahmet 95
 Aral, Elif Macide 131
 Ardiç, Medine 136
 Arıdoğan, Buket Cicioğlu 103, 135, 140
 Arıkan, Soykan 89, 121
 Arıncı, Atilla 135
 Arslan, Hakiye 142
 Arslantürk, Ahmet 109, 110
 Arslan, Uğur 146
 Arslanyılmaz, Zehra 124
 Aslan, Deniz 92
 Aslan, Hacer 114
 Aslan, Müge 126
 Aşçıoğlu, Sibel 99
 Aşık, Gülşah 96, 120, 139, 141
 Atalay, Esra 77, 127
 Atalay, Mustafa Altay 107, 130
 Atalay, Tuba 101
 Atanasova, Juliana 87
 Atasoy, Ali Rıza 93, 96, 137, 141, 144
 Atik, Tuğba Kula 99, 119
 Atmış, Volkan 112
 Avcı, Gülçin Alp 145
 Avcioğlu, Fatma 95, 124
 Ayaş, Mehmet Ramazan 100
 Ayçık, Özlem Doğan 91, 125
 Aydemir, Şöhret Sabire 116
 Aydemir, Yusuf 94, 141
 Aydın, Faruk 125
 Aydın, Fuat 108, 115, 116
 Aydın, Hakan 133, 142
 Aydın, Merve 138, 141
 Aydın, Nesibe Nur 99, 138
 Aydoğan, Sibel 134, 137
 Aykın, Nevil 145
 Aynalı, Ayşe 103, 135, 140
 Aytar, Asiye Altınöz 121, 123, 124
- B**
- Babayiğit, Mustafa Alparslan 133
 Bachiyska, Elizabeta 87
 Badur, Selim 8
 Bakkaloğlu, Zekiye 62
 Baran, İrmak 96
 Bayık, Seyit Ahmet 96
 Baykan, Mahmut 139
 Baylan, Orhan 99, 119
 Bayramoğlu, Gülçin 125
 Bayram, Yasemin 95
 Baysallar, Mehmet 87, 112
 Baysan, Betil Özhak 129
 Baysoy, Gökhan 91
 Bayyurt, Nizamettin 122
 Bektöre, Bayhan 99, 104, 119
 Berktaş, Mustafa 100
 Bıçakçığıl, Asiye 114
 Biçmen, Can 143
 Bilgen, Nüket 103
 Bilge, Yıldız Dallar 86
 Bilgin, Kemal 117
 Boral, Barış 112, 131
 Bostancı, Erdal Birol 137
 Bozarı, Sedat 100
 Bozbaş, Aysun 114
 Bozdayı, Güleendam 65, 86, 137
 Bozdoğan, Bülent 98, 108, 116
 Bozkurt, Derya 114
 Bozkurt, Gökhan 91
 Bölek, Bora Kazım 89, 121
 Brankova, Nadia 87
 Bulut, Aslı 120
 Bulut, Cemal 91
 Bulut, Mesut 120, 123, 124, 138
 Buruk, Celal Kurtuluş 125
 Büyük, Yalçın 117
 Büzkaya, Yasemin 103
- C**
- Caner, Ayşe 73, 127
 Can, Hüseyin 75
 Can, Şükran 98
 Ceylaner, Gülay 137
 Ceylan, Mehmet Reşat 95
 Cilo, Burcu Dalyan 110, 124, 139
 Cinel, Murat 112
 Civelek, İlkay 92
 Coşgun, Yasemin 86
 Coşkun, Aslıhan 86
 Coşkun, Meral 143
- Ç**
- Çağatay, Mustafa 120
 Çağlayık, Dilek Yağcı 129
 Çakar, Aslı 114
 Çakmak, Ayşe 126
 Çalışkan, Emel 121, 123
 Çavuşoğlu, Cengiz 51, 106
 Çekmez, Ferhat 128
 Çekmez, Yasemin 132
 Çelikkilek, Nevreste 137
 Çelik, Gülden 140
 Çetin, Emel Sesli 103, 135, 140
 Çetinkaya, Merih 128
 Çetinkaya, Özgül 141
 Çevik, Figen Çağlan 145
 Çıklaçıcı, Dilek 134
 Çıkman, Aytekin 95, 138, 141
 Çırak, Meltem Yalınay 19, 106, 107, 119
 Çiçek, Bahattin 114
 Çiçek, Muharrem 131
 Çiftci, Alper 92

Çiftçi, İhsan Hakkı 93, 94, 96, 97, 137,
141, 144
Çiftçi, Esra 103, 135, 140
Çitil, Burak Ekrem 140
Çolak, Dilek 31, 129, 131, 133
Çörtük, Oğuz 135

D

Dadalı, Mümtaz 105
Dağı, Hatice Türk 146
Dalgıç, Buket 86
Dal, Mehmet Sinan 115
Dal, Tuba 93, 98, 115
Damar, Çağrı 106
Dansuk, Zeynep 123, 124
Daş, Taner 87, 117
Dede, Ayşe 121, 123
Dede, Murat 136
Delialioğlu, Nuran 97, 102
Delice, Safiye 134
Demircan, Sedat 106
Demir, Cengiz 120, 141
Demirci, Mustafa 128, 136
Demirel, Mahmut Mete 143
Demiröz, Ali Pekcan 91
Demir, Tülin 105
Dereli, Şevket 143
Diker, Kadir Serdar 58, 94, 103, 104, 109
Dikme, Reşat 88, 127
Dinç, Bedia 86, 137
Dinç, Öykü 135
Dinleyici, Ener Çağrı 16
Direkseneli, Güher Saruhan 140
Divanoğlu, Yörük 94, 109
Dizbay, Murat 119
Doğan, Bora 86
Doğan, Metin 142
Doğan, Özlem 121
Dolapçı, İştah 88, 113
Doni, Nebiye Yentür 88, 127
Döşkaya, Mert 71, 127
Duman, Özgür 129
Durmaz, Abdullah 133
Durmaz, İhsan 129
Durmaz, Rıza 62, 86, 87, 93, 95, 96, 97,
101, 103, 109, 110, 139
Durmüşlu, Ayça Özer 137
Dursun, Ayşe 137

E

Ece, Cem 92
Ece, Gülfem 92
Efe, Kadir 139
Ekinci, Özgür 137
Ekin, Sabahattin 92

Elbey, Hüseyin 135
Elgörmüş, Neval 87
Elmalı, Ferhan 130
Elma, Yunus Emre 92
Emekdaş, Gürol 97, 102
Ener, Beyza 124
Engin, Doruk 114
Erbil, Ömer Faruk 140
Erdem, Ali Fuat 141
Erdem, Ümmü Gül 120, 123, 124, 138
Erdem, Yunus 131
Erdoğan, Merve 125
Erdönmez, Demet 145, 146
Erensoy, Selda 78
Ergin, Çağrı 44, 93
Ergin, Sevgi 135
Ergünay, Koray 91, 129, 138
Ergüven, Sibel 91, 126
Er, Halil 120
Erkan, Kübra 145, 146
Erman, Aylin Daloğlu 131
Ermertcan, Şafak 99
Eroğlu, Cafer 117, 120
Esen, Nuran 30
Eser, Özgen 40, 112

F

Feyzioğlu, Bahadır 142
Fındık, Duygu 146
Fidancı, Muzaffer Kürşat 132
Fidan, Işıl 126, 127, 138

G

Genişel, Neslihan 115
Goossens, Valere 135
Göçlü, Ertuğrul 141
Gödekmerdan, Ahmet 98, 108, 116
Gökahmetoğlu, Selma 130, 134
Gökbalp, Nilgün 129
Gökmen, Tülin Güven 118, 143
Gök, Yaşar 93
Görgülü, Özkan 105
Gözalan, Ayşegül 97
Gözen, Ayşe Gül 106
Göz, Yaşar 100
Güldemir, Dilek 86, 93, 96, 103
Güldüren, Hakkı Mustafa 145
Güler, Nermin 107, 111, 113
Gülhan, Barış 138, 141
Gülhan, Timur 92
Gül, Kadri 98
Güllüce, Ayten 142
Gülmez, Dolunay 125
Gültekin, Meral 36
Gümrall, Ramazan 133, 136

Gümüş, Defne 92
Günaydın, Murat 120
Günay, Pınar 116
Gündüz, Ayрыз Tuba 143
Güner, Ahmet 89
Güneş, Ömer 128
Güney, Akif Koray 120
Güngör, Serdar 128, 136
Güngörürler, Eda 108
Güran, Mümtaz 118
Gürses, Gülcan 88, 127
Gürüz, A. Yüksel 69, 127
Güvenç, Hülya İren 130
Güven, Deniz Can 99
Güven, Gülsüm Biten 121, 123
Güzelant, Asuman 130

H

Hasanoğlu, Sevde 92
Hasçelik, Gülşen 103, 105
Hasdemir, Ufuk 100
Hatipoğlu, Çiğdem Ataman 91
Haydari, Farzad 118
Hazırolan, Gülşen 96
Hızal, Gülin 91
Hızal, Sinem 94
Hızlısoy, Harun 108, 116
Honca, Mehtap 132
Honca, Tevfik 132
Hoşbul, Tuğrul 104

İ

İlkit, Macit 88
İlki, Zeynep Arzu 100, 119
İnan, Dilara 131
İnkaya, Ahmet Çağkan 91, 99, 102, 126,
131
İşeri, Latife 101

K

Kabay, Nilgün 93
Kaftan, Osman 143
Kaklıkkaya, Neşe 125
Kalaycioğlu, Atila Taner 62, 86
Kalaycı, Tuğçe 128
Kalaycı, Yıldız 118, 143
Kaleli, İlknur 93
Kalkancı, Ayşe 13, 125, 126
Kaman, Başak 138
Kanat, Tuğba 106
Kandemir, İdris 115
Kandemir, Tülay 118
Kangaba, Achille Aime 112
Kantardjiev, Todor 87
Karabay, Oğuz 141

Karabıçak, Nilgün 88
 Karacan, Mehmet 141
 Karacan, Nurdan 109
 Karadağ, Adil 117, 120
 Karademir, Ahu 89
 Karagöz, Alper 62, 87, 93, 95, 96, 102, 103, 109, 110, 139
 Karagül, Aydan 114, 129, 138
 Karahan, Zeynep Ceren 88, 113
 Karahocagil, Mustafa Kasım 95
 Karakan, Tarkan 18
 Karakaş, Ümit 99, 119
 Karakeçe, Engin 94, 96, 97, 137
 Karakeçili, Faruk 110
 Karakucak, Mutlu 137
 Karakuş, CebraİL 121, 122
 Karakuş, Resul 127
 Karaltı, İskender 140
 Karaman, Onur 143
 Kara, Soner Sertan 106
 Karatuna, Onur 88, 108, 144
 Karayel, Ferah 87
 Kaşali, Kamber 113
 Kaş, Elif 121, 123
 Kaya, Deniz Ece 108
 Kaya, Elif 98
 Kaya, Filiz Demirel 126
 Kaya, Gamze 107, 111, 113
 Kaya, Güven 128
 Kaya, İnci Başak 103, 109
 Kaya, Meral 130
 Kaya, Selçuk 103, 135, 140
 Kayman, Tuba 98, 108, 116
 Kaynar, Leylagül 130
 Kekilli, Arda 116
 Keklik, Muzaffer 130
 Keleş, Selma Uludağ 92
 Kesmen, Zülal 142
 Keşli, Recep 120, 139, 141
 Kılıç, Abdullah 81, 87, 96, 112
 Kılıç, Hüseyin 107, 130
 Kılıç, Nida 95
 Kılınçel, Özge 95
 Kınıklı, Sami 91
 Kırca, Fisun 97, 137
 Kızılyıldırım, Suna 118, 143
 Kipritçi, Öner 107, 111, 113
 Kocagöz, Sesin 38, 108
 Kocagöz, Tanıl 2, 108, 114, 144
 Kocazeybek, Bekir 135
 Koçak, Nadir 95
 Koç, Ayşe Nedret 107
 Koç, Sermet 87
 Koç, Yasemin Işık 106, 119
 Korkmaz, Pınar 145

Korukluoğlu, Gülay 62, 67, 86, 129
 Korutürk, Gülay 140
 Köksalan, Orhan Kaya 57
 Köksal, Fatih 118, 143
 Körkoca, Hanifi 100, 102
 Köroğlu, Mehmet 97, 137, 141
 Köse, Şükran 135
 Kubar, Ayhan 96, 128, 132, 133, 136
 Kurt, Aslı Giray 114
 Kurtoğlu, Muhammed Güzel 130
 Kurutepe, Semra 99
 Kuştımur, Semra 126
 Küçükler, Mine Anğ 92
 Külah, Canan 93, 94
 Küpesiz, Alphan 133

L

Lale, Zübeyde 138
 Leventoğlu, Sezai 137
 Levterova, Victoria 87
 Limoncu, Mine Hoşgör 116

M

Maçın, Salih 91, 102
 Menemenlioğlu, Dilek 129
 Meral, Melda 86, 118, 143
 Metan, Gökhan 46, 130
 Mete, Şebnem 104, 109
 Mosayyebi, Solmaz 145, 146
 Mumcuoğlu, İpek 96
 Mutlu, Derya 33, 129, 131, 133
 Müderris, Tuba 97, 134
 Müştak, Hamit Kaan 94, 103, 104, 105, 109, 115

N

Nazik, Hasan 107, 111, 113

O

Oğuz, Vildan Avkan 132
 Okullu, Sinem Öktem 108, 114
 Okur, Arzu 106
 Okuyan, Ömer 143
 Opuş, Ayşegül 130
 Orkun, Ömer 126
 Oskovi, Hülya Seyed 138
 Otlu, Barış 21, 92, 98, 108, 114, 116
 Ovalı, Mehmet Akif 89
 Oygür, Nihal 133

Ö

Öcal, Duygu 88, 113
 Ögünç, Dilara 129, 133
 Öksüz, Şükürü 95

Ölmez, Serpil 99
 Önal, Süleyman 103, 135, 140
 Öncül, Oral 99
 Öngüt, Gözde 131
 Önlen, Cansu 118, 143
 Özakin, Cüneyt 110
 Özbek, Ahmet 137, 141
 Özbek, Özgen Alpay 132
 Özcan, Nida 98, 115
 Özçelik, Neslinur 92
 Özdal, Merve 103, 109
 Özdem, Birsen 134
 Özdemir, Mehmet 111, 139, 142
 Özdemir, Türkan 107
 Özden, Özben 91
 Özekinci, Tuncer 115
 Özen, Hasan 91
 Özgün, Ayşe 87, 117
 Özgür, Müjdat 111
 Özkan, Seçil 86, 137
 Özkan, Şengül 103
 Özkarataş, Emre 132
 Özkuyumcu, Cumhuri 114
 Özkütük, Aydan 27
 Özkütük, Nuri 54
 Özmen, Büşra Betül 88, 113
 Özmerdiven, Gülşah Ece 124
 Özsoy, Sevim 119
 Öztaş, Sevil 139
 Öztürk, Candan 97
 Öztürk, Cihadiye Elif 95
 Öztürk, Tuba 103, 135, 140
 Öz, Yasemin 126
 Özyurt, Mustafa 99, 104, 119

P

Pakaştıçalı, Nagehan 107, 111, 113
 Paker, İrem Onur 136
 Paksu, Şule 145
 Panaiotov, Stefan 87
 Parkan, Ömür Mustafa 107, 130
 Petek, Mustafa 144
 Pınar, Ahmet 129, 138
 Pilancı, Özgür 135
 Polat, Meltem 106
 Purtuloğlu, Tarık 132

R

Reis, Ahu 125
 Rota, Seyyal 138

S

Saat, Tuğçe 104
 Sağlam, Filiz Yarımcam 112
 Sağlam, Necdet 145, 146

Sağlam, Sezcan 124
 Sağlık, İmran 129, 131, 133
 Salih, Barık 89, 121, 122
 Saraçlı, Mehmet Ali 96, 133
 Sarıbaş, Zeynep 52
 Sarıgüzel, Devrim 108
 Sarıkaya, Ayşegül Topal 92
 Sarınoğlu, Rabia Can 129, 131, 133
 Sarreyyüpoğlu, Barış 131
 Saruç, Murat 114
 Satılmış, Özgün Kiriş 93
 Sayar, Erolcan 106
 Sayiner, Ayça Arzu 25, 132
 Sayiner, Hakan Sezgin 140
 Selek, M. Burak 99
 Selek, Mehmet Burak 119
 Selimoğlu, Ayşe 114
 Serin, Mehmet Sami 97
 Sertöz, Rüçhan Yazan 80
 Severcan, Feride 106
 Seyhan, Tuba 146
 Seyrek, Adnan 88, 127
 Sırıken, Belgin 104
 Sirekbasan, Serhat 135
 Solmaz, Sinem 119
 Söğüt, Mehtap Ünlü 92
 Söyletir, Güner 4, 116, 119
 Sugita, Takashi 125
 Sünnetçioğlu, Mahmut 95

Ş

Şahan, Özlem 94, 104, 109
 Şahiner, Fatih 128, 132, 133, 136
 Şahin, İdris 95, 124
 Şahin, Muhammed Feyzi 87
 Şardan, Yeşim Çetinkaya 91, 112
 Şen, Ece 111
 Şener, Aslı Gamze 128, 136
 Şener, Burçin 131
 Şener, Kenan 128, 136
 Şener, Yusuf Ziya 131
 Şenol, Güneş 143
 Şentürk, Nermin Başak 140
 Şimşek, Halis 91
 Şimşek, Hülya 109, 110

T

Tamay, Zeynep 107, 111, 113
 Tanrıverdi, Yeliz 117
 Tapısız, Anıl 106
 Tarakçı, Eda Altan 135
 Tarhan, Gülnur 105, 109, 110, 140
 Taşbent, Fatma Esenkaya 111, 139
 Taşdemir, Elif Vural 102
 Taşlı, Hüseyin 99

Tekeli, Alper 88, 113
 Teke, Turgut 142
 Tekin, Alicem 93, 98, 115
 Tekinşen, Fatma Filiz 107
 Tekintaş, Yamaç 116
 Terzi, Hüseyin Agah 93, 94, 96
 Tezer, Hasan 106
 Tiftikçi, Arzu 114
 Timur, Demet 107
 Timurkan, Mehmet Özkan 133, 142
 Tokman, Hrisi Bahar 112
 Toprak, Nurver Ülger 116
 Torun, Ebru 94, 104
 Torun, Müzeyyen Mamal 112
 Torunoğlu, Mehmet Ali 86
 Tosun, Gökçen 92
 Tosun, İlknur 125
 Tözün, Nurdan 114
 Tuncer, Serdar 105
 Tunçcan, Özlem Güzel 119
 Tunç, Emine 92, 98, 114
 Tunç, Turan 128
 Turan, Nuri 135
 Turhan, Özge 133
 Tüfekçi, Fuat 125
 Tünger, Alper 116
 Türkay, Cansel 122
 Türkmen, Kültigin 141
 TÜROSA Çalışma Grubu 62

U

Uğur, Melahat 145
 Ulupınar, Zeynep 121, 122
 Uner, Mahmut Celalettin 105
 Us, Dürdal 138
 Uslu, Merve 89, 121, 122
 Usta, Eğemen 120
 Uyanık, Merve Sakarya 144
 Uz, Ebru 134
 Uz, Gülşen 92
 Uzun, Berrin 128, 136

Ü

Ünalı, Özlem 97, 101
 Ünal, Serhat 102
 Ünübol, Nihan 108

V

Vardareli, Eser 114

Y

Yağmur, Gülhan 87, 117
 Yalçınkaya, Tülay 135
 Yanık, Keramettin 117, 120
 Yapar, Mehmet 128, 132, 136

Yardımcı, Hakan 94
 Yaşar, Zühre Doğru 145
 Yavşan, Mehmet 142
 Yavuz, Ceren 104
 Yazgan, Ayça Sayı 114
 Yazıcı, Duygu 89, 121, 122
 Yeşilyurt, Emine 126
 Yetiman, Ahmet Evren 142
 Yıldırım, Muzaffer 87, 117
 Yıldırım, Tuba 104
 Yıldız, Mehmet Taha 121
 Yıldızoğlu, Üzeyir 133
 Yılmaz, Ferda Fethiye 116
 Yılmaz, Hüseyin 135
 Yılmaz, Kerem 99
 Yılmaz, Suzan Öztürk 97
 Yılmaz, Şule Kırca 92
 Yılmaz, Yakut Akyön 91, 99, 102
 Yiğit, Nuri 133, 136
 Yolbakan, Sultan 86
 Yoldaş, Özlem 141
 Yordonova, Stanislava 87
 Yüksekaya, Şerife 130
 Yürüken, Zehra 101

Z

Zarakolu, Pınar 112
 Zeyrek, Fadile Yıldız 88, 127
 Ziyade, Nihan 87
 Zorbozan, Orçun 93

KONGREYE DESTEK VEREN KURULUŞLAR *

ABBOTT LABORATUVARLARI İTH. İHR. ve TİC. LTD. ŞTİ.

BECTON DICKINSON

ROCHE DIAGNOSTICS TURKEY A.Ő.

EUROIMMUN

ATQ BİYOTEKNOLOJİ

BIOMERIEUX

KURUKAHVECİ MEHMET EFENDİ

HACI BEKİR

* Firma isimleri sağlanan katkı sırasına göre yazılmıştır.