

# Hastane İnfeksiyonlarında Laboratuvarın Rolü

**Dr. Gülşen HASÇELİK\***

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

Hastane infeksiyonları son otuz yıldır infeksiyon hastalıkları içinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle son yıllarda tanı ve tedavi amacıyla yapılan tetkiklerdeki ilerlemeler, bu infeksiyonların kontrolünde mikrobiyoloji laboratuvarlarının rolünü daha öne çıkarmıştır.

Hastane infeksiyon riskinin azalması süreyans çalışmaları ile sağlanmakta, infeksiyon süreyansının yapılabilmesi de mikrobiyoloji laboratuvarlarında değerlendirilen kültür sonuçları ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle, bir hastanede infeksiyon kontrol çalışmalarının başarıya ulaşabilmesi için mikrobiyoloji laboratuvarının infeksiyon kontrol programlarının bütün aşamalarında aktif olarak rol alması gerekmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarından sorumlu bir uzman, infeksiyon kontrol komitesinin bir üyesi olarak, laboratuvar ile ilgili her türlü aktiviteden sorumlu olmakta ve bu uzmana hastane infeksiyonlarının tanısı, tedavisi ve önlenmesinde önemli görevler düşmektedir.

Hastane infeksiyonlarında mikrobiyoloji laboratuvarlarının görevlerini üç başlık altında toplamak mümkündür. Bu görevler:

## 1) LABORATUVARIN PRİMER ROLÜ

**A) İnfeksiyon etkenlerinin doğru olarak tanımlanması**

**1. Örneğin kalitesi:** İnfeksiyona neden olan mikroorganizmaların doğru olarak tanımlanması, herşeyden önce laboratuvara gelen klinik örneğin kalitesine bağlıdır. Uygun olmayan örneğe laboratuvarında uygulanan tüm işlemler hem laboratuvarı meşgul eder, hem klinisyene yanlış bilgiler aktarılmasına ve hastanın bu tetkikler için lüzumsuz para ödemesine yol açar.

Bu nedenle mikrobiyoloji laboratuvarlarının görevi laboratuvara henüz klinik örnek gelmeden başlamaktadır. Bu aşamada mikrobiyoloji uzmanları laboratuvara gelen örnek kalitesini denetlemeli, laboratuvara materyal kabulünde belirli kriterler koymalı ve gerektiğinde klinisyenlere bu konuda eğitim vermelidir. Laboratuvara gelen örneklerde gerçek infeksiyon etkeni üretildiği ölçüde infeksiyon süreyans verileri değerli olmaktadır.

Örnek kalitesinin değerlendirilmesi öncelikle örnek alınımında temel olarak dikkat edilmesi gereken kurallarla başlar.

1) Örnek antibiyotik tedavisinden önce alınmalı.

2) Örnek gerçek infeksiyon yerinden alınmalı (Hiçbir zaman pnömoni tanısı için balgam yerine tükürük, sinüzit tanısı için nazal sekresyon gönderilmemelidir.)

3) Örneğin ne zaman alınacağı bilinmeli (Hastalığın patogenezi bilinerek hastalığın belirli evrelerinde uygun bölgelerden kültür alınmasına dikkat edilmelidir. Örneğin enterik ateşte 1. hafta kan, 2. hafta idrar, 3. hafta dışkı gibi).

4) Yeterli miktar ve hacimde örnek alınmalı

(Örnek yetersizliğine bağlı olarak yalancı negatif sonuçlar rapor edilebilir).

5) Örnek uygun toplama kaplarında ve uygun taşıyıcı ortamlarda laboratuvara bir an önce ulaştırılmalı:

- Boğaz, deri, mukoz membranlar için eküvyon
- İdrar, balgam, dışkı için steril, sızıntı yapmayan, ağız burgulu kaplar
- Vücut sıvıları için steril enjektör ve ponksiyon iğneleri
- Anaerob kültür örnekleri için anaerob transport besiyerleri, havası boşaltılmış, iğni ucu kapatılmış enjektör
- Serolojik tanı için daha önce kullanılmamış temiz tüplere alınan 5-10 mL kan örneği (Serum yağ içermemeli, hemolizsiz ve yeterli miktarda olmalı, hemen laboratuvara iletilemiyorsa buzdolabında saklanmalıdır)
- Transport besiyerleri (Stuart's, Cary-Blair, Amies) eküvyon ile alınan örnekleri 48-72 saat saklayabilir.

6) Örnek ve hasta hakkında bilgiler, gönderildiği bölüm doğru ve detaylı bir şekilde yazılmalı. İstek formlarında:

- Tarih
- Hasta adı-soyadı ve yaşı
- Dosya ve/veya protokol no
- Servis veya poliklinik adı
- Örneğin cinsi ve ne zaman alındığı
- Kullanılan antibiyotik ve ilaçlar
- Klinik bulgular ve ön tanı
- Varsa altta yatan hastalık
- İzleyen Dr. adı ve tel no bulundurulmalıdır.

Bütün bu şartlara uyulduğu tahmin edilerek laboratuvara kabul edilen klinik örneğin uygun olup olmadığı laboratuvar tarafından kontrol edilmelidir. Örneğin yapılan idrar kültür incelemesinde üç veya daha fazla mikroorganizmanın üremesi, idrar kültürünün yanlış alındığını, kan kültüründe normal deri florası bakterilerinin üremesi ve klinikle uyumsuz çıkması alım yönteminin yanlış olduğunu, balgamın mikroskopik incelemesinde 100 x büyütmede > 10 epitel hücresi, <25 lökosit görülmesi örneğin tükürük ile karıştırılmış, orofaringeal materyal olduğunu gösterir.

**2. Tanı amacıyla yeterli ve uygun tekniklerin kullanılması:** Son yıllarda hastane infeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların çeşitlerinin artmasıyla (bakteri, virüs, mantar, parazit) mikrobiyoloji laboratuvarları bu etkenleri izleyerek yeni selektif kültür ve mikrobiyolojik teknikleri kullanarak doğru tanıya gitmelidirler.

#### (a) Selektif kültür yöntemlerinin kullanılması

Bu konu özellikle salgınlarda önem kazanmaktadır. Örneğin ağır kanlı diyare ve hemolitik üremik sendroma neden olan *E. coli* O157H7 suşunu izole etmek için özel selektif bir besiyeri olan sorbitol içeren Mac Conkey besiyeri kullanılmalıdır.

*C. difficile*'nin etken olduğu antibiyotiğe bağlı kolitlerde sitotoksin veya enterotoksinin dışkıda gösterilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte özellikle epidemiyolojik çalışmalara ışık tutması amacıyla, bu mikroorganizmanın izolasyonu için Cefoxitin-cyclosporine fructose agar (CCFA) kullanılmalıdır.

Yine metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) salgınlarında, MRSA'yı, çoklu dirençli koagülaz-negatif stafilokoklardan ayırt etmek için Mannitol salt agar (%7.5 NaCl içeren) veya %4 NaCl içeren Mueller Hinton selektif besiyeri kullanılmaktadır.

Dışkıdaki vankomisin dirençli *E. faecium* suşlarının saptanmasında ise Mueller Hinton agar (vankomisin 20 µg/mL, polimiksin 100 µg/mL, streptomisin 100 µg/mL) selektif besiyeri önerilmektedir.

#### (b) Özel mikrobiyolojik tekniklerin kullanılması

Mikrobiyolojide bazı mikroorganizmaların tanımlanmasında veya antibiyogramında özel tetkiklerin kullanılması gerekmektedir. Örneğin penisiline dirençli pnömokokların disk difüzyon yöntemi ile saptanmasında (NCCLS) koyun kanlı Mueller Hinton agarına 1µg oxacillin diski (breakpoint: 25 mm) kullanılması önerilmektedir. Yine tüberkülozun antimikrobiyal duyarlılığın saptanmasında Middle Brook 7H10 veya 7H11 agarına çeşitli antitüberküloz ilaçlar ilave edilerek yapılmakta ve bunun için 4 hafta inkübasyon süresi gerekmektedir. Bunun yanında BACTEC radyometrik sistemi ile bir hafta veya daha az sürede sonuç alınabilmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalara yarar sağlaması açısından mikroorganizmaların tür düzeyinde ta-

nımlama yapabilecek hızlı testlere gereksinim vardır. Bugün birçok rutin mikrobiyoloji laboratuvarları yarı veya tam otomatik cihazlarla tür düzeyinde tanımlama yapabilmektedir. Bu nedenle kullanılan hızlı testler kısa sürede sonuç vermesi ve laboratuvar standardı sağlaması açısından önem kazanmıştır.

Son yıllarda immünolojik ya da DNA prob yöntemleri ile RSV, HSV gibi çeşitli ajanların 1-2 saat içinde tanılarını veren sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerin kullanılmasında dikkatli karar verilmeli, duyarlılık, özgüllük, yalancı pozitif ve negatiflik gibi özellikleri gözden geçirilmelidir. Bütün bu özel mikrobiyolojik tetkiklerin yapılmasından laboratuvarların masraf ve yararlılık oranları da göz önüne alınmalıdır.

#### **B) Mikroorganizmaların tanısının tür düzeyinde yapılması**

Mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması hastane kaynaklı enfeksiyonlar açısından çok önemlidir. Örneğin *P. aeruginosa* veya *P. cepacia*'nın neden olduğu enfeksiyonların epidemiyolojik seyri farklılık göstermektedir. Yine *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesi tedavi ve bu enfeksiyonların kontrolü açısından önem kazanmaktadır.

#### **C) Antibiyotik duyarlılık testleri**

Hastane enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında mikroorganizmaların tanımlanmalarının yanında antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının da bilinmesi gerekmektedir. Rutin laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılık testlerini saptamak için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmaktadır. Disk difüzyon tekniğinin standardize edilmediği antibiyotiklerde ise tüp dilüsyon, agar dilüsyon gibi yöntemler tercih edilmektedir. Ancak son yıllarda yarı otomatik ve otomatik sistemlerle MIC konsantrasyonları da saptamak mümkündür.

Laboratuvar, NCCLS önerileri doğrultusunda hastane enfeksiyon kontrol komitesi ile birlikte antibiyotik duyarlılık testinde kullanılacak antibiyotikleri seçmeli ve en az yılda bir antibiyotik direnç durumunu gözönüne alarak, testte kullanılacak antibiyotik listesini belirlemelidir. Ayrıca antibiyotik duyarlılık test sonuçları sınırlı bildirim şeklinde olmalı, çalışılan tüm antibiyotiklere direnç bulunduğu ikinci grup antibiyotik listesine geçilmelidir.

Laboratuvar kalite kontrol çalışmaları olarak kullanılan antibiyotik disk kontrolü ve diğer parametreleri kontrol etmelidir.

#### **D) Laboratuvar test sonuçlarının zamanında bildirilmesi, uygun şekilde rapor edilmesi ve verilerin saklanması ve özet verilerin sunulması.**

Mikrobiyoloji laboratuvar kültür sonuçlarının testler bittiğinde en kısa zamanda bildirilmesi gerekmektedir. Laboratuvar personeli gerektiğinde enfeksiyon kontrol personeli ile direkt iletişime girerek izole edilen mikroorganizmanın kolonizasyon veya enfeksiyon olduğuna karar vermelidir. Bazı durumlarda enfeksiyon etkeni olabilecek patojen bir mikroorganizma şüphesinde test sonuçları beklenmeden klinisyen ve/veya enfeksiyon kontrol komitesine ön bildirim yapılmalıdır.

#### **Ön bildirim yapılması gereken durumlar:**

- Kan ve steril vücut örneklerinden (BOS) mikroorganizma izolasyonu.
- Enterik patojenlerden *Salmonella* ve *Shigella* izolasyonu
- Aside dirençli bakterinin yaymada veya kültürde saptanması
- Yeni veya daha önce saptanmamış bir mikroorganizmanın görülmesi (örneğin: *Legionella* türleri)
- Çoklu direnç veya alışılmamış direnç patternine sahip bir mikroorganizmanın üremesi (örneğin: MRSA, vankomisin dirençli enterokok).

Birçok olguda ön bildirim yapılması hastane enfeksiyon seyrinde son rapordan daha önem kazanmaktadır. Bu da enfeksiyon kontrol ve korunma önlemlerinin bir an önce yapılmasını sağlamaktadır.

Laboratuvar kayıtlarına tarih, örneğin cinsi, hastanın yattığı bölüm ve servis, dosya no'su, üretilen mikroorganizmanın cinsi, türü ve antibiyotik duyarlılık durumu, yapılmışsa özel tiplendirme işlemi sonuçları işlenmelidir. Seçilmiş mikrobiyolojik bilgiler belirli dönemlerde periyodik olarak klinisyen ve enfeksiyon kontrol komitesine bildirilmelidir. Bildirimler belirli patojen mikroorganizmaların izolasyon sıklığına, anatomik bölgeye, hastane servislerine, antibiyotik duyarlılıklarına göre yapılmalıdır. Tüm laboratuvar kayıtları bilgisayar sisteminde depolanmalıdır.

### E) Kalite kontrol çalışmaları

Hastane laboratuvarının klinisyene doğru sonuç verebilmesi için ilk önce kendisinin sonuçtan emin olması, yani laboratuvar kalite kontrol çalışmaları yapması gerekmektedir. Laboratuvar sonuçlarının kalitesinin yüksek olması da yapılan sürveyans çalışma sonuçlarını olumlu yönde etkileyecektir.

Laboratuvar sorumlusu kalite kontrolü olarak laboratuvarında kullanılan malzemeleri denetlemeli, bunların standartlara uygun olup olmadığını test etmelidir. Ayrıca laboratuvar sorumlusu uzman çalışanlarının eğitiminden sorumlu olmaktadır.

## II) HASTANE İNFEKSİYON KONTROL KOMİTESİ ÜYESİ OLARAK GÖREVİ

**A) Bilgilendirme:** Mikrobiyoloji laboratuvarından sorumlu uzman infeksiyon kontrol komitesinin doğal bir üyesi olarak, bu komitenin diğer üyelerini mikrobiyoloji konusunda bilgilendirmelidir. Bu konuda çalışan infeksiyon kontrol hekimini (örnek alma, ekim teknikleri, yapılan testler ve antibiyotik duyarlılıkları) özellikle kültür sonuçlarının değerlendirilmesi konusunda yardımcı olmalıdır. Aynı zamanda bu uzman epidemiyolojik temel kavramları da öğrenmelidir.

**B) Salgın durumunda özel çalışmalar:** Salgında veya hastane infeksiyonlarında artış gözlemlendiğinde, klinik mikrobiyoloji laboratuvarı infeksiyon kontrol zincirinin önemli bir parçası olarak en kısa zamanda araştırmalara başlayarak etken olan mikroorganizmanın izolasyonu ve tanımlamasını yapmalıdır. Araştırmada daha önce hastanede salgına neden olan infeksiyon etkenleri, salgının görüldüğü bölüm de göz önüne alınmalıdır. Bütün bu çalışmalarda laboratuvar - klinisyen işbirliği önem kazanmaktadır.

Hastane infeksiyonlarına bağlı salgınlarda salgın olan bölümde kaynağa ve geçiş yoluna bakılarak hastalardan, personelden (burun, nazofarinks, el, dışkı gibi), tıbbi aletlerden, çevreden (yüzey, hava, su gibi) kültür alınmalıdır. Özellikle personel eli kültürleri, infeksiyona neden olan mikroorganizmaların hastadan hastaya taşınmasında önem kazanmaktadır. El kültürleri alınırken burada bulunan mikroorganizmaların geçici veya kalıcı flora olup olmadığını saptamak için buyyon-torba (broth-bag) tekniği kullanılmaktadır. Bu teknikte kültürü alınacak eller, içinde 10-20 mL adi buyyon içeren steril plastik torbalar

inde yıkanmakta, daha sonra sıvı besiyerinden selektif ve selektif olmayan besiyerlerine ekim yapılarak bakteri üremesi değerlendirilmektedir. Torba içindeki adi buyyon antiseptikleri nötralize etmek için Tween 80, sodyum tiyosülfat veya lesitin içermektedir.

Personel el kültürleri yanında salgın zamanlarında alınacak tüm kültürlerin özel metodlarla alınması, ekilmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir. Örneğin çevreden yüzey kültürleri yapılmak istendiğinde kültürlerin sürüntü veya direkt ekim, baskı ekimi (impression plate) şeklinde yapılması, sudan alınan örneklerin ise membran filtre yöntemi ile ekilmesi önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda sudan yapılan kültürlerle hastalık arasında belirgin bir korelasyon bulunamamıştır. Havadan alınacak örnekler, belli bir miktar havanın belli bir zaman dilimi içinde süzülerek, filtrelerin besiyerine ekimi yapılarak değerlendirilmektedir. Ayrıca hava kültürleri besiyerlerinin belirli bir süre örnek alınacak bölgelere açılması ile de alınabilmektedir. Fakat bu önerilen bir yöntem değildir. Havadan alınacak kültürlerde kontaminasyon değerlendirilmesinin zor olması ve infeksiyon ile korelasyon bulunamaması bu kültürlerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır.

Hastane infeksiyonlarında epidemiyolojik veriler ve hastane infeksiyon patojenleri de düşünülerek çapraz infeksiyona neden olabilecek kan ve parenteral sıvılardan, solunum cihazlarından, dezenfektanlardan ve antiseptiklerden örnek alınabilir. Bu kültürlerin çoğu standart olmayan, değerlendirilmesi zor kültürlerdir. Hastane infeksiyonlarına neden olan salgınlarda çapraz infeksiyona neden olabilen infeksiyon kaynaklarının ve buralardan alınacak örneklerin kültür metodları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Salgınlara neden olan hastane infeksiyonlarında alınacak kültürlerin laboratuvar yükünü artırmayacak şekilde selektif ve ayırıcı besiyerlerine veya özel hastane infeksiyonlarına neden olan patojenleri ortaya çıkarmak için zenginleştirici besiyerlerine ekilmelidir. Bütün bu kültürlerin alınması, değerlendirilmesi yer, personel ve para gerektirmektedir. Bu amaçla yapılan tüm masraflar hastalara yapılan harcamalara eklenmemelidir.

Genel kural olarak salgın dönemleri dışında rutin olarak hastane personeli ve çevre kültürleri alınması maliyetlerinin yüksek olması, klinik

**Tablo 1.** Hastane İnfeksiyonlarına Neden Olan Salgınlarda Çapraz İnfeksiyona Neden Olabilen İnfeksiyon Kaynakları ve Kültür Metodları.

Kaynak	Kültür metodu
Personel eli	Buyyon-torba tekniği: 10-20 mL adi buyyon içeren steril plastik eller yıkanarak semikantitatif olarak ekimi yapılır
Hava	Mekanik hava filtresi metodu (önerilen); havaya plak açılma yöntemi
Su	Membran filtre yöntemi
Çevre yüzeyleri	Sürüntü örneklerinin katı plağa ekimi veya baskı plağı şeklinde ekim
Kan ürünleri	Sıvı besiyerine ekilen kan örneklerinin aerobik ve anaerobik olarak 10 günlük inkübasyonu
Parenteral sıvı ve intravenöz aletler	Buyyon ekimi veya membran filtre yöntemi
Solunum aletleri	Buyyon veya sürüntü örneklerinin ekimi
Tüp ve kaplar	Buyyon veya sürüntüden semi kantitatif olarak ekimi
Dezenfektan ve antiseptikler	Ürünlerin spesifik nötralle edici ajanlarla ve bu ajanlar olmaksızın seri dilüsyonlarla ekimi

ve epidemiyolojik yararlarının olmaması nedeniyle önerilmemektedir.

Rutin olarak yapılması önerilen mikrobiyolojik kültürler:

a) Sterilizasyonun denetlenmesi (otoklav, pastör fırını, kimyasal, biyolojik yöntemler)

b) Bebek mamalarının kontrolü (nonpatojen bakteri sayısı 25 cfu/mL olmalı, *Salmonella-Shigella* olmamalı)

c) Hastanede hazırlanan ürünler, açıkta hazırlanan kan ürünleri, dializ sıvıları, dezenfekte edilmiş aletler.

### III) MİKROORGANİZMALARIN EPİDEMİYOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASINDAKİ GÖREVİ

Hastane infeksiyonlarına bağlı salgınlarda bir bölümde değişik hastalardan aynı tip bakterinin üretilmesi, bulaşın aynı kaynaktan hastadan hastaya bulaştığını göstermektedir. Bu durumda kaynağın ve geçiş yolunun bulunabilmesi için hastane infeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların kökenlerinin araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla laboratuvar izole ettikleri suşları stok yaparak epidemiyolojik çalışmalara destek vermelidir.

Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak mikroorganizma tiplendirme metodlarının uygulanması kolay, hızlı, güvenilir ve ucuz olanı tercih edilmektedir. İdeal tiplendirme metodu birbirinden ilişkisiz suşu tek bir suş olarak belirleyen

metod olarak tarif edilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda altın standard bir metod veya kesin bir tiplendirme metodu tanımlanamamıştır. Bununla birlikte iki suşun aynı veya farklı olduğunu saptamak ve klinisyene yanıt vermek amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan metodları iki grupta incelemek mümkündür:

#### A. FENOTİPİK TİPLENDİRME (GELENEKSEL TİPLENDİRME)

Fenotipik tiplendirme salgınlarda bazen yararlı olabilmektedir. Örneğin *Escherichia coli* O157:H7 gibi bazı patojen bakterilerde bulunan bazı fenotipik özellikler tek başına salgınlarda hastalığın kaynağının bulunmasında yardımcıdır. Bununla birlikte, belirli mikroorganizmalarda ortak fenotipik özelliklerin bulunması nedeniyle alt tiplendirilmeye gereksinim duyulmaktadır. Bazı bakteriler aynı fenotipik özelliğe sahip olmakla birlikte genotipik özellikleri farklıdır, bu da infeksiyonlarda kaynağın iki farklı suştan oluştuğunu göstermektedir. Fenotipik tiplendirmenin dezavantajları şu şekilde özetlenebilir:

a) Suşların antijenik özelliklerinin değişken olması,

b) Antibiyotik direnç paternlerinin antibiyotik tedavisinden etkilenmesi,

c) Metodlarda kullanılan gerekli ayıraçların ticari olarak standart bulunmaması,

d) Çevrenin selektif basıncından etkilenmesi,

e) Her bir suşun tür düzeyinde ayırımının suşların ayırımında yeterli olmaması.

#### **Fenotipik tiplendirme metodları:**

- a) Cins, türünün belirlenmesi
- b) Biyotiplendirme (BIYO)
- c) Serotiplendirme (SERO)
- d) Bakteriosin tiplendirmesi (BAK)
- e) Faj tiplendirmesi (FAJ)
- f) Antibiyotik duyarlılık testleri (ADT)

#### **a) Cins ve türünün belirlenmesi:**

Fenotipik tiplendirme metodlarından mikroorganizmaların cins ve tür ayırımının belirlenmesinin epidemiyolojik çalışmalarda değeri oldukça sınırlıdır. Örneğin *E. coli*, *S. epidermidis* veya *P. aeruginosa* insanda normal florada veya çevrede bulunabilmektedir, bu nedenle tür düzeyinde bakterilerin tanımlanması salgınlarda kaynağın bulunmasında yetersiz kalmaktadır.

#### **b) Biyotiplendirme:**

Fenotipik metodlar içinde en eski metodlardan birisi biyotiplendirme. Biyotiplendirme hücresel enzim aktivite paternini göstermektedir. Birçok laboratuvar otomatik biyotiplendirme ile bakteri tanımlaması yapmaktadır. Biyotiplendirmenin farklı suşları ayırmadaki değeri sınırlıdır. Biyotiplendirmenin dezavantajları arasında:

1) Aynı suşun gen ekspresyonunu ile mutasyonu veya random mutasyonu sonucu, bir veya daha fazla biyokimyasal reaksiyon göstermesi nedeniyle farklı suş olarak tanımlanması,

2) Spesifik test ayıracılarının geliştirilmesinin zor ve pahalı olması,

3) Test ayıracılarının bir çok laboratuvarında bulunamaması sayılabilir.

#### **c) Serotiplendirme:**

Serotiplendirme metodları bakterilerin çok değişik serotipinin bulunması, antiserumların pahalı olması ve tüm laboratuvarlarda bulunamaması, yapılan tüm serotiplendirme çalışmalarına rağmen bazı suşların tiplendirilememesi nedeniyle yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yetersiz kalmaktadır.

#### **d) Bakteriyosin tiplendirmesi:**

Bakteriyosin tiplendirmesi izole edilen suşun diğer bakteriler tarafından oluşturulan tok-

sinlere karşı duyarlılığına dayanmaktadır. Bu metod daha çok referans laboratuvarlarında yapılan ve çok kullanılmayan bir metottur.

#### **e) Faj tiplendirmesi:**

Bakteriyofaj, bakteri hücrelerini infekte eden ve çoğu kez bakteri hücrelerinin erimesine neden olan virüsler olarak tanımlanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda faj tiplendirmesi değişik bakteriyofajların bakteriyi eritmedeki duyarlılık ve direncine göre değerlendirilmektedir. Bu metod stok fajların ve kontrol suşların ancak referans laboratuvarlarında bulunması ve tüm bakteriler için bu metodun kullanılmaması nedeniyle tercih edilmemektedir.

#### **f) Antibiyotik duyarlılık testleri:**

Fenotipik tiplendirmede antibiyotik duyarlılık testleri uygulama ve değerlendirme kolaylığı ve ucuzluğu nedeniyle en fazla kullanılan yöntemdir. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları enfeksiyon kontrolünden sorumlu uzman tarafından incelenmekte, çeşitli hastalardan yeni veya az görülen bir direnç paterni gözlemlendiğinde bu testler salgın için uyarıcı olmaktadır. Örneğin erişkinlerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarında yüksek ampisilin direnci saptandığında klinisyenler tedavide başarısızlıkla karşılaşabilecekleri için uyarılmaktadır. Ayrıca bu test sonuçları hastanede vankomisin-dirençli *Enterococcus* suşlarının, endemik olmayan bölgelerde MRSA suşlarının saptanması ile yararlı ve uyarıcı olmaktadır.

#### *Antibiyotik duyarlılık testlerinin;*

a) Çok duyarlı veya çok dirençli olduğu bilinen bakterilerin (örneğin: streptokoklar, *Pseudomonas* türü bakteriler) tiplendirilmesinde yetersiz kalması,

b) Bakterilerin fenotipik olarak değişkenlik göstermesi,

c) Antibiyotiklerin hastanelerde yaygın kullanımını nedeniyle antibiyotik direncinin selektif olarak baskılanmış olması,

d) Testlerde kullanılan antibiyotiklerde standart olmaması nedeniyle kullanımını sınırlı kalmaktadır.

## **B. GENOTİPİK TİPLENDİRME (MOLEKÜLER TİPLENDİRME)**

Genotipik tiplendirme metodlarından birçoğu fenotipik tiplendirme metodlarının aksine hastane enfeksiyonlarına neden olan birçok pa-

tojen bakterinin ayırımında büyük bir alet, ayıraç ve yöntemde büyük bir değişiklik olmaksızın kullanılabilir. Epidemiyolojik çalışmalarda genotipik tiplendirme metodları fenotipik tiplendirme metodlarından daha değerlidir. Özellikle salgınlarda fenotipik tiplendirme ile birlikte değerlendirildiğinde daha önem kazanmaktadır. Genotipik metodların rutinde uygulanabilir olması için klinikte kullanımının kolay olması, ucuz, hızlı, kolay ulaşılabilir olması, birçok patojene uygulanabilir olması, benzer fakat eş olmayan mikroorganizmaları ayırt edebilmesi ve geleneksel yöntemlerden daha fazla bilgi vermesi gerekir. Bu yöntemler:

#### a) DNA'ya dayalı yöntemler:

- 1) Plazmid profil analizi (PPA)
- 2) Restriksiyon endonükleaz analizi (REA)
- 3) Southern hibridizasyon analizi (SHA)
- 4) Pulsed field gel elektroforez (PFGE)
- 5) DNA hidridizasyonu
- 6) RNA (Ribotyping)
- 7) Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)
- 8) Arbitrarily primed PCR (AP PCR)

#### b) Proteine dayalı yöntemler:

- 1) Immunoblot fingerprinting (IMM)
- 2) Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
- 3) Multilokus enzim elektroforezi (MEE)

Bu metodlardan özellikle DNA'ya dayalı metodlar bir ve birden fazla metodun birlikte kullanılması ile kolonizasyon-infeksiyon ayırt edilmesinde, hastanede yatan hastalarda çapraz infeksiyon varlığının gösterilmesinde, kontaminasyon ile patojen olan suşların ayırt edilmesinde ve tedavi edilen hastalarda reinfeksiyon-rölaps ayırımında yardımcı olmaktadır.

#### a) DNA'ya dayalı yöntemler

##### 1) Plazmid profil analizi (PPA)

Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan ilk genotipik tiplendirme metodudur. Bu metod agaroz jel elektroforezi ile plazmid moleküllerinin ayırımını takiben plazmid DNA'sının ekstraksiyonu ile gerçekleşmektedir. PPA basit, az alet gerektiren ve salgınlardaki infeksiyonlarda kullanılmaya uygun bir metodur.

Plazmid profil analizinin avantajları şu şekilde özetlenebilir:

- a) Birçok bakteri suşu için kullanılabilir olması,
- b) Testlerin analizinin bir günde tamamlanabilir olması,
- c) Yirmidört veya daha fazla kültürün aynı zamanda işleme konulabilmesi,
- d) Gen ekspresyonu (örn: Yüzey antijen veya spesifik protein) gerektirmemesi,
- e) Az madde kullanılması,
- f) Hızlı, ucuz ve güvenilir olması

#### PPA'nın dezavantajları arasında;

- a) Salgına neden olan suşun plazmid içermemesi veya plazmid izolasyonunun zor olması,
- b) Plazmidlerin (özellikle R-plazmidleri) kaybedilebilir veya kazanılabilir olması,
- c) Ekstrakromozomal element olarak plazmidlerin organizmanın sabit genotipini yansıtmaması sayılmaktadır.

#### 2) Restriksiyon endonükleaz analizi (REA)

Bu metod PPA'dan farklı olarak bakteri suşlarındaki küçük farklılıkları benzer profillerle ayırt edilmektedir. Bu testte eğer izole edilen suşun kromozomal band sayısı çok fazla ise (yaklaşık 103) spesifik bandların biribiri üzerine binmesi ile bakteri ayırımı zorlaşmakta; bu nedenle REA'da agaroz jel elektroforezi yerine PFGE kullanılması önerilmektedir.

#### 3) DNA hidridizasyonu

Bu teknik bakterilerden başka mikobakteri, virüs (CMV, rotavirüs, papilloma virüs), mikoplazma ve mantar gibi mikroorganizmaların ayırımında da kullanılmaktadır. Özellikle *Candida albicans* salgınlarında epidemiyolojik çalışmalarda yararlı olmaktadır. Bu yöntemin diğer avantajları arasında:

- a) Üreyen veya canlı patojen mikroorganizmalara gereksinim göstermemesi,
- b) Zor üreyen ve virulansı yüksek mikroorganizmaların tanımlanmasında güvenli bir şekilde uygulanabilmesi,
- c) REA'de görülen band sayısını azaltması,
- d) Bakteri suşları arasındaki farklılığı ayırt edebilmesi sayılmaktadır.

#### 4) Ribozomal RNA (rRNA) (Ribotyping)

Bu metod tüm gram negatif basiller, *Legionella* türleri ve bazı stafilokok suşların cins, tür ve

gruplarına özgü rRNA'ya dayalı problemlerin kullanılmasıyla çalışılmaktadır. Fenotipik metodların mikroorganizma ayırımında yetersiz kaldığı durumlarda belirli bakterilerin ayırımında kullanılmaktadır.

### 5) Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Bugün moleküler tiplendirme metodları içinde PCR'ın bakterilerin tanımlanmasında ve birbirinden ayrılmasında en duyarlı metod olduğu gösterilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalarda PCR'ın yararları şu şekilde özetlenmektedir:

a) Mikroorganizmaların veya ürünlerinin direkt olarak tiplendirilebilmesi,

b) Toksin, virulans faktörleri ve antibiyotik direncini kodlayan genlerin saptanabilmesi,

c) Az sayıdaki mikroorganizmayı saptayabilmesi,

d) İn vitro koşullarda üremeyen veya yavaş üreyen mikroorganizmaları belirleyebilmesi,

e) Hızlı olması,

f) İnfekte ajana karşı antikor yanıtına gereksinim göstermemesi,

g) Mikroorganizmaların aktif çoğalma dönemlerine gereksinim göstermemesi; latent dönemde de saptanabilmesi,

h) Çeşitli vücut sıvılarından (beyin omurilik sıvısı, göz sıvısı, fetal kan gibi) mikroorganizmaların saptanabilmesi.

Bugün PCR metodu salgınlarda mikroorganizma tanımlanmasında, bazı hastalıkların patogenezini ve mikroorganizmaların geçiş yollarının saptanmasında kullanılmaktadır. Örneğin enterotoksijenik *E. coli*'nin, toksijenik olmayan suşlarından ayırt edilmesinde başarı ile kullanılmaktadır. Ayrıca hastane enfeksiyonlarına neden olan *Legionella* enfeksiyonlarında kaynağın ve geçiş yolunun saptanmasında, mikobakteri ve *Candida albicans* enfeksiyonlarına bağlı salgınlarda PCR metodunun büyük yarar sağladığı görülmüştür.

PCR metodunun dezavantajları arasında;

a) Kontamine DNA'nın amplifikasyonu ile yabancı pozitif sonuç alınması,

b) Farklı mikroorganizmalarda benzer nükleik asit parçalarının (sequence) bulunması nedeniyle yanlış pozitif sonuç verilmesi,

c) Pozitif kontrollerin belirli süre sonunda çalışmaması,

d) Aktif enfeksiyon ile asemptomatik latent faz döneminin, mikroorganizmaların kronik salınımı nedeniyle ayırt edilememesi,

e) RNA veya DNA'nın saptanması ile aktif enfeksiyon tanısının konulamaması,

f) Yetersiz sayıda primer kullanılması ile yanlış negatif sonuçların alınması sayılabilir.

### 6) Arbitrarily primed PCR (AP PCR)

Konvensiyonel PCR yönteminin bir varyantı olan AP PCR birçok salgında epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Örneğin meningokoklara bağlı menenjit salgınlarında, *Clostridium difficile*'nin patojen ve patojen olmayan suşlarının ayırımında ve MRSA salgınlarında bu metodun başarı ile sonuç verdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Genotipik tiplendirme metodlarından DNA'ya dayalı metodların genel dezavantajları arasında karışık DNA paternlerini değerlendirmedeki zorluklar, metod farklılığı, isimlendirme, referans suşlarında standart olmaması ve DNA ekstraksiyonundaki problemlerden dolayı DNA profil değişikliği sayılmaktadır.

### b) Proteine dayalı yöntemler

#### 1) Immunoblot fingerprinting (IMM)

Mikroorganizmaların spesifik antiserum veya pooled insan serumu kullanılarak yapılan bu yöntem, özellikle *C. difficile*, *S. aureus*, *C. albicans* ve *A. fumigatus* suşlarına bağlı salgınlarda, bu suşların tanımlanmasında başarı ile kullanılmıştır. Bu metodda da standart ayıraçların bulunmaması, antiserumların kaynağına göre çok değişik paternlerin izlenmesi, her paterde fazla sayıda band görülmesi bu testlerin değerlendirilmesini zorlaştırmakta, bu da metodun duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır.

#### 2) Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

Poliakrilamid jel elektroforezi ile protein profillerinin ortaya çıkarılması esasına dayanan bu test, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. difficile*, *C. albicans* ve *A. fumigatus* suşlarının saptanmasında kullanılmıştır. Karışık band paternlerinin görülmesi, çalışma şartlarına ve ayıraçlarına göre testin değişkenlik göstermesi ve duyarlılığının düşük olması nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda önerilen bir yöntem değildir.

#### 3) Multilokus enzim elektroforezi (MEE)

Bu metod epidemiyolojik çalışmalarda başa-



**Tablo 2.** Klinik ve Referans Laboratuvarlarında Kullanılan Epidemiyolojik Tiplendirme Metodlarının Karşılaştırılması

Tiplendirme metodları <sup>a</sup>	Değerlendirme <sup>b</sup>			
	Testlerin performansı	Testlerde kullanılan ayıraçların bulunabilirliği	Suşları ayırt edebilme	Epidemiyolojik değerlendirme
<b>Fenotipik</b>				
ADT	++++	++++	++	+++
BİYO	+++	++++	++	++
SERO	++	++	++	+++
BAK	++	+	++	++
FAJ	+	+	+++	+++
<b>Genotipik</b>				
PPA	++++	++++	+++	+++
REA	+++	++++	++++	++++
SHA	++	++++	++++	++++
PFGE	+++	++++	++++	+++
IMM	++	++	++	++
PAGE	++	++++	++	++
MEE	+++	++++	+++	+++

a Kısaltmalar yazıda verilmiştir

b ++++ değer +++' den daha iyidir

rı ile kullanılmaktadır. Özellikle *L. pneumophila*, *Haemophilus* türleri, *S. marcescens*, *S. aureus*, *E. coli* ve türlerine bağlı salgınlarda mikroorganizma tanımlanmasında önerilen bir metottur. Yapılışının kolay olması, ayıraçların bulunabilir olması, enzim profillerinin stabil olması ve suşları ayırmada yüksek performans göstermesi bu metodun avantajları arasında sayılmaktadır. Yöntemde birçok hastane infeksiyonuna neden olan patojen mikroorganizma için standartizasyonun olmaması bu yöntemin epidemiyolojik çalışmalarındaki değerini sınırlamaktadır.

Yukarıda belirtilen moleküler metodların ancak sınırlı bir bölümü klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yapılabilmekte, diğerlerinin ise araştırma laboratuvarında yapılması gerektiği vurgulanmaktadır. Klinik ve referans laboratuvarlarında kullanılan epidemiyolojik tiplendirme metodlarının karşılaştırılması Tablo 2'de gösterilmiştir.

Son yıllarda yeni tiplendirme metodlarının hızlı bir şekilde ilerlemesi, birçok hastane infeksiyonuna neden olan mikroorganizmaların epidemiyolojisine yeni ufuklar açmakta, bunlarda gelecekte salgınlarda laboratuvar-epidemiyolog ilişkisiyle hastane infeksiyonlarının önlenmesinde yardımcı olacaktır.

siyonuna neden olan mikroorganizmaların epidemiyolojisine yeni ufuklar açmakta, bunlarda gelecekte salgınlarda laboratuvar-epidemiyolog ilişkisiyle hastane infeksiyonlarının önlenmesinde yardımcı olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Akalın HE (ed). Hastane infeksiyonları. 1. Basım. Güneş Kitabevi, Ankara, 1993.
2. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990;322:178-83.
3. Eisenstein BI. New molecular techniques for microbial epidemiology and diagnosis of infectious diseases. J Infect Dis 1990;161:595-602.
4. Emori GT, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993;6:428-42.
5. Greene JN, Stratton CW. Role of the microbiology laboratory in hospital epidemiology and infection control. In: Mayhall CG (ed). Hospital Epidemiology and Infection Control. Williams and Wilkins, 1996.
6. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: Application of contemporary tech-

- niques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis 1993;17:153-64.
7. Mc Gowan JE Jr. Role of microbiology in prevention and control of nosocomial infections. In: Lennete EH (ed). Manual of Clinical Microbiology 4th ed. American Society for Microbiology, Washington DC. p:105-122, 1985.
  8. Pfaller MA. Microbiology: The role of the clinical laboratory in hospital epidemiology and infection control. In: Wenzel RP (ed). Prevention and Control of Nosocomial Infections. 2<sup>nd</sup> ed. Williams and Wilkins, 1993.

**YAZIŞMA ADRESİ:**

Doç. Dr. Gülşen HASÇELİK  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Hacettepe - ANKARA