

Moleküler Biyolojik Tiplendirme Yöntemlerinin Hastane İnfeksiyonlarında Kullanımı

Dr. Fatih KÖKSAL*

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

Hastane infeksiyonlarının kontrolü ve önlenmesi hiç şüphesiz ki multidisipliner katımlı bir ekip işidir ve klinik mikrobiyologlar bu ekibin vazgeçilmez üyeleridir. Ekip, hastane infeksiyonlarının kontrolünde her hastadan izole edilen kuşku izolanları tanımlar ve bu mikroorganizmaların epidemiyolojisi ile ilgilerini, kaynaklarını, hastalar veya hastaneler arasındaki olası geçiş yollarını belirleyerek gerekli tedbirleri almaya çalışır. Bu bağlamda kararlar sıklıkla kültür sonuçlarının baz olarak alındığı mikrobiyolojik testler dikkate alınarak verilir. Ancak kültür sonuçlarının nasıl yorumlanacağı ve bazı spesifik problemler karşısında ne tür çözümler üretileceği konusunda mikrobiyologlar yardımcıdır. Özellikle stafilokoklar, enterokoklar, enterobakteriler, *Pseudomonas* ve *Candida*'lar gibi hastane infeksiyonlarında önem arz eden, ancak mikro-çevrede ve florada da sık görülen mikroorganizmalara ait izolanların bir infeksiyonu mu yoksa normal florayı mı yansıttığı, hastadan elde edilen tekrarlayan izolanların basit kontaminasyonu mu, kolonizasyonu mu yoksa reinfeksiyon veya reaktivasyonu mu gösterdiği cevaplanmalıdır. Çünkü her cevabın çözümü bir diğerinden farklı olacaktır.

tır. İşte bu soruların cevaplanabilmesi için mutlaka mümkün olduğu kadar hızlı, doğru, kullanılabilir klonal seviyede sonuçlar veren ileri tetkikler yapılması gereklidir. Bununla beraber yapılacak ileri tetkikler, maliyet parametreleri de gözönüne alınarak infeksiyonların kontrolünde veya hasta bazında tedavideki yararı dikkate alınarak seçilmelidir. Bunun için de yine mikrobiyoloğun özel problemlerden haberinin olması gereklidir.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları yukarıda bahsedilen ve hastane infeksiyonlarındaki insidansları ve önemleri gittikçe artan klasik bakterileri izole edip tür bazında tanımlayacak donanıma sahiptir. Ancak yine klinik ve epidemiyolojik olarak önemli salgınlara sebep olan *Acinetobacter*'ler, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, çoklu ilaç direnci gösteren mikrobakteriler, *C. albicans* dışındaki kandida türleri, *Aspergillus* ve *Fusarium* türü mantarlar, *P. carinii*, *Cryptosporidia*'lar, *Cyclosporidia*'lar ve *Microsporidia* gibi parazitler ve HCV, HBV, RSV, CMV ve HIV gibi virüslerin tanısında yeni seçici ve zengin besiyerleri ve ileri teknoloji ürünü olan moleküler tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulur. Yine hastane salgınlarından izole edilen mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık kalıplarının süratle belirlenmesi de korunma ve kontrol açısından son derece önemli epidemiyolojik bulgulardır. Çünkü metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), penisilin dirençli *S. pneumoniae*, vankomisin dirençli enterokoklar ve enterokok dışındaki gram pozitif koklar gibi hastane kökenli suşlar türünün diğer

örneklerine göre duyarlı olmaları beklenen anti-biyotiklere karşı çoklu ilaç direnci gösterirler. İşte klasik kültür yöntemleri ile gerektiği gibi çözümlenemeyen bu problemlerin çözümünde otomatize sistemler ve moleküler biyolojik tanı yöntemleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına yardımcı olmamaktadır. Otomatik sistemlerle klasik kültür yöntemlerine göre çok daha kısa sürede çok daha az örnekle %90-95 oranında güvenilirlik derecesine sahip sonuçlar alınabilmiş ve birçok büyük hastane laboratuvarında bu sistemler klasik sistemlerin yerini almıştır. Ancak bu sistemlerin hastane epidemiyolojisi çalışmaları için önemli olan iki eksiği giderilememiştir. Bunlardan ilki direnç tespiti ile ilgilidir. Otomatize sistemlerde genetik olarak kontrol edilen direncin 3-5 saat içerisinde belirlenmesi yalnızca duyarlılık kalıplarını yaratır. Yani MRSA, penisilin dirençli *Streptococcus*, Van-B bağımlı vankomisin dirençli enterokoklar amfoterisin-B, triazol ve echinocandin dirençli *Candida*'lar ve *Aspergillus*'lar gibi önemli patojenlerde güvenilir sonuçların eldesi her zaman mümkün değildir. İkinci önemli eksiklik de epidemiyolojik tiplendirmedeki yani klonal tiplendirmedeki yetersizliktir. Gerek klasik kültür izolasyonu ve identifikasyonu bazı sistemler gerekse otomatize sistemler genellikle mikroorganizmanın, uzun sürede sonuç verip yoğun laboratuvar çalışmalarına ihtiyaç duyan, yetersiz sayıda ve yorumlanması güç ancak gen ekspresyonuna bağlı olarak değişebilecek stabil olmayan fenotipik özelliklerini baz olarak alırlar. İşte bu anlamda moleküler biyolojik yöntemler sadece izolasyonunda zorluk çekilen patojenlerin tanısı amacı ile değil aynı zamanda hastane infeksiyonları ile epidemiyolojik anlamda ilişkisi düşünülen hastane içi klinik ve çevresel örneklerle hastaneler arası salgınlardan izole edilen suşların tür ve tip bazında identifikasyonuna olanak sağlar. Bir örnekten izole edilen suşun kısa bir süre içerisinde gerçek anlamda bir hastane epidemisi ile ilişkisini göstermek ve o klonun kaynağına ulaşmak, kontrol politikaları oluşturmak açısından son derece önemlidir.

EPİDEMİYOLOJİK TIPLENDİRME

Hastane infeksiyonlarının kontrolünde salgınlardan elde edilen tür ve tür içerisindeki suşların klonal ilişkileri ve ilişkili suşlarda kaynağın belirlenmesi son derece önemlidir. Bu ilişkileri ortaya çıkarabilmek için suşların tanımlanması, birbirleri ile benzerlikleri ve daha da önemlisi

farklılıklarının ortaya konulması gereklidir. Yani epidemiyolojik olarak tiplendirilmeleri gerekmektedir. Tiplendirmede kullanılacak yöntemler test edilen suşlardan kesin sonuçlar çıkartabilmeli, yer ve zaman bağımlılığı olmaksızın her çalışmada aynı sonuçları üretmeli ve epidemiyolojik olarak ilgisiz suşları belirleyebilmelidir. Epidemiyolojik tiplendirme klasik olarak fenotipik özellikler veya gen karakterleri belirlenerek yapılabilir.

Fenotipik Tiplendirme Yöntemleri

Fenotipik tiplendirme yöntemleri arasında sık kullanılanları bakterinin antibiyotik duyarlılık kalıpları, biyokimyasal ve antijenik profili, faj duyarlılık kalıpları, multilokus enzim elektroforesis profilidir. PAGE de protein profili ve immüblotlama ile sitoplazmik veya hücre duvarı antijen profilinin belirlenmesi gibi yöntemlerdir. Her ne kadar hastane infeksiyonları epidemiyolojisi ile çalışan grupların çoğu tarafından "first line" yöntemler olarak bu testler yeterli bulunmuşsa da gerçek anlamda daha çok benzerlikleri ortaya koyan bu yöntemler yeteri kadar ayırım yeteneğine ve kullanılabilirlik özelliklerine sahip değildir. Bu testlerin yumuşak karnı:

1. Genotipik ekspresyon veya varyasyonlarla değişebilecek stabil olmayan karakterleri kullanmaları,
2. Sınırlı sayıda özelliği ortaya koyabilmeleri,
3. Farklı özelliklerin ortaya çıkarılması için metodların önemli ölçüde modifikasyonları gerektirmeleri,
4. Yavaş, emek yoğun, pahalı ve yorumlanması problemli sonuçlar üretmeleridir.

Oysa mikroorganizmalarda kromozomal plazmid veya mitokondria DNA'sını ve DNA'daki farklılıkları ortaya koyarak tiplendirmenin yapıldığı genotipik epidemiyolojik metodlar fenotipik tiplendirme metodlarının eksikliklerini önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır.

Moleküler Biyolojik Tiplendirme Yöntemleri (Genotipleme)

Bu metodlarda temel prensip, DNA'nın uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri (REE) ile hazmettirilmesi sonucu ortaya çıkan polimorfik DNA parçacıklarının elektrikli bir ortamda agaroz jel veya akrilamid jelde migrasyonel separasyona tabii tutularak parça büyüklüğüne göre ayrıştırılması (RFLP) ve ayrışan parçaların jel-

de oluşturdukları bandların ethidium bromide ile boyanarak veya işaretli probalar kullanılarak görüntülenmesi esasına dayanır (DNA parmakizi). Genotiplenmede hedef DNA, kromozomal DNA, kromozom üzerindeki belirli gen bölgeleri, varsa plazmid'e veya mitokondria'ya ait DNA olabilir. Yine hedef DNA direkt restriksiyon endonüklezlerle (RE) hazmettirileceği gibi PCR ile amplifiye edildikten sonra jel üzerinde direkt veya RE hazmettirilerek analiz edilebilir (Tablo 1).

Epidemiyolojik olarak tek atadan (klonal) çoğalan suşlar jel üzerinde diğer suşlardan yani epidemiyoloji ile ilişkisi olmayan suşlardan farklı, üniform band kalıpları oluşturacaklardır. Bu farklı band oluşumları genetik farklılığı dolayısıyla ata-sal farklılığı yansıtmaktadır. Fenotipik metodlara göre daha güvenilir sonuçların üretildiği genotipik metodların en önemli avantajları şunlardır:

1. Standardize edildikleri zaman stabil karakterlerdir.
2. Tüm farklı polimorfik özelliklerini ortaya koyabilirler. Yani güçlü ayırım yeteneğine sahiptirler.
3. Benzer reagenler, aletler ve prosedürler kullanılarak bakteriler, virüsler, mantarlar ve pa-

razitler gibi oldukça farklı mikroorganizma türleri için kullanılabilir.

4. Ucuz, hızlı, basit ve duyarlı yöntemlerdir.

İşte bu özellikleri ile moleküler biyolojik teknikler yani genotiplenme teknikleri, mevcut problemlerine rağmen hastane enfeksiyonlarının izlenmesi ve kontrolünde klinik mikrobiyologlara devrim olarak tanımlanabilecek önemli avantajlar sağlamıştır. Bu yöntemler altyapı yetersizlikleri, buna bağlı olarak yapılan çalışmaların halihazırda genel sonuçlar çıkartabilmek için yetersiz oluşu ve standardizasyonun olmayışı sebebi ile yaygın olarak kullanım alanı bulamamışlardır. Ancak gelecek vadede bu yöntemleri kronolojik olarak kısaca tanımlamak, avantaj ve dezavantajlarını irdeledikten sonra bir sonuç çıkartmak daha doğru olacaktır.

Moleküler biyolojik yöntemleri; nonamplifiye DNA'nın kullanıldığı direkt genotiplenme yöntemleri ve amplifiye DNA'nın kullanıldığı yöntemler olarak iki başlıkta değerlendirebiliriz.

1. Direkt DNA'nın Hedef Alındığı Yöntemler A. Plazmid DNA kalıpları

Bakteri genotiplenmesinde kullanılan ilk moleküler biyolojik yöntemdir. Bakteri içerisindeki

Tablo 1. Moleküler Biyolojik Bazlı Genotiplendirme Yöntemleri.

<ul style="list-style-type: none">• Direkt genotiplenme<ul style="list-style-type: none">Plazmid parmakizi (fingerprinting)Genomik DNA restriksiyon fragment length polimorfizmi<ul style="list-style-type: none">Kromozomal DNA-RFLPrDNA-RFLPSouthern hibridizasyonPulsed field gel electrophoresis (PFGE)Mitochondrial DNA-RFLP• Amplifikasyon bazlı genotiplenme<ul style="list-style-type: none">PCR-RFLPAmplifiye fragment length polimorfizmi (AFLP)PCR-rDNARepetitive element polimorfizm-PCR (REP-PCR)Multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP)<ul style="list-style-type: none">Arbitrary primed PCR (AP-PCR)Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)DNA amplifikasyon fingerprinting (DAF)

DNA'nın sayı ve büyüklüğüne göre jel üzerinde elektrikli ortamda separasyonu sonucu oluşan bandların polimorfizmine göre oluşan farklılıkları baz alır. Plazmid DNA'sının ekstraksiyonunun basit ve hızlı oluşu bu yöntemin yaygın olarak kullanım alanı bulmasını sağlamıştır. Bu yöntemle elde edilen sonuçların birçok araştırmacı tarafından yeterli bulunması ve yöntemin gerçek anlamda bazı bakteri türleri için yüksek ayırım yeteneği göstermesine rağmen yöntemle ilgi giderek azalmıştır. Çünkü mikroorganizmaların çoğunda plazmid bulunmamaktadır. Aynı atadan gelen klonal suşlar plazmidi kazanabildikleri gibi sonradan da kaybedebilmektedirler. Nihayet inseriyon ve delezyonların yaygın olarak görüldüğü ve kolay olduğu plazmid DNA profili ile tiplene ve subtiplemenin kabul edilebilirliği tartışılmaktadır.

B. Kromozomal DNA restriksiyon endonükleaz analizi

Bu anlamda kromozomal DNA'nın tamamı veya rezistans kodlayan veya rRNA'yı kodlayan (rDNA) gibi özel gen bölgelerinin bir veya birden fazla özel REE kullanılarak hazımı sonunda oluşan polimorfik DNA parçacıklarının uzunlukları (Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm-RFLP) incelenir.

Kromozomal DNA-RFLP yönteminde öncelikle mikroorganizmanın kromozomu ekstraksiyon ve plazmid DNA'sından kurtarılma için pürifikasyon işlemine tabi tutulur. Daha sonra çift sarmallı kromozomal DNA'yı 4-6 bp uzunluğundaki spesifik bölgelerinden kesebilen SstI, BglII, XhoI, SalI, HpaII ve HinfI gibi enzimlerle hazım işlemi yapılır. Bu enzimler son derece spesifik olarak DNA'yı 1.000-20.000 bp arasında değişen büyüklükte parçalara ayırırlar. Üretilen bu parçalar agaroz jelde büyüklüklerine göre hareket ederek ayrışırlar ve suş için spesifik RFLP olarak tanımlanan band kalıpları oluştururlar. Bu kalıplara parmakizi de (DNA fingerprinting) denir.

Bu yöntem basit, hızlı sonuç veren tek tek günlük örneklerle uygulanabilen bir yöntem olma avantajına sahiptir. Ancak hazım sonucu üretilen genomik fragmanların sayısının çok fazla oluşu okuma ve değerlendirmeyi güçleştirir. Mesela 6 bp uzunluğunda spesifik bölgeleri kesen SstI restriksiyon enzimi ile *E. faecalis* suşlarında 95'den fazla band oluşmaktadır. Bu son yorumlanması ve standardizasyonu son derece zor bir profildir. Benzerlikler ve farklılıkları fark etmek

imkansız derecede zordur. Sistemin otomasyona ihtiyacı vardır veya modifikasyonlarla kullanımı mümkün olabilir. Bu modifikasyonlar ya direnç genleri, IS genleri ve rDNA (ribotipleme) gibi spesifik gen bölgelerinin RFLP analizini yapan ya işaretli problemlerle belirli genleri araştırarak farklılıkları ortaya çıkaran (southern hibridizasyon) veya daha büyük parçaları kesebilen restriksiyon endonükleazlar yardımı ile daha az sayıda fakat daha uzun fragmentleri üreten Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE) gibi yöntemleridir.

1. Southern hibridizasyon yöntemi: Bu yöntemde ekstraksiyon ve pürifikasyon işleminden sonra uygun RE tarafından hazmettirilen ve agaroz jelde separe edilen farklı uzunluktaki DNA fragmentleri bir naylon membrana transfer edilir. Daha sonra kromozom üzerindeki bilinen bir gen, rDNA veya IS gibi hedef herhangi bir bölgeyi tanıyan işaretli DNA veya RNA problemleri kullanılarak komplementer DNA ile hibridizasyon gerçekleştirilir.

2. Ribotipleme (rDNA-RFLP): rRNA'yı kodlayan kromozomal gen bölgeleri RE ile hazmettirilerek ortaya çıkan ürünlerin fragment uzunluğu analiz edilir. Bu gen bölgesinin bütün bakterilerde bulunması ve birden çok kopyasının bulunması testin kullanılabilirliğini artırır. Bu yöntemle bütün bakteri türleri ve tür içindeki subgrupların tespiti mümkündür. Ancak birden çok enzimin kullanılması, işlemlerin uzun ve emek yoğun oluşu bu yöntemin en önemli dezavantajlarıdır.

3. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE): Bu yöntemle kromozomal DNA'yı daha büyük ancak daha az sayıda fragmentlere ayıran Lambda/HindIII ve NheI gibi uzun enzimler kullanılır. Bu enzimlerle hazım sonucunda 10 Mb yani yaklaşık olarak 10.000 kb uzunluğunda DNA fragmentleri üretilir. Klasik sürekli elektroforezde agaroz jelde ancak 30-50 kb uzunluğundaki DNA fragmentlerinin ayırımı mümkündür. Çünkü agaroz jelde 50 kb'dan daha uzun olan parçalar düzenli tek yönlü akım ile jel üzerinde yoğun tek bir band şeklinde hareket ederler. Ancak akımın yönü veya açısı periyodik olarak değiştirilirse büyük ve küçük fragmentler birbirlerinden ayrılacaktır. Elektrikli alanda elektrik yönü veya açısındaki her bir değişik uygulama esnasında küçük parçalar yeni direktifler doğrultusunda daha hızlı hareket ederek büyük parçalardan kopacaktır. Böylece büyük fragmentler daha geride

küçükler ise önde olmak üzere yeniden dizilim ortaya çıkacaktır. Bu yöntem özel cihazların kullanımını gerektiren bir tekniktir. Kullanılan cihazlar iki başlık içerisinde değerlendirilebilir. Bunlardan ilki basit manüplasyonlarla yani bir anahtarla akımın yönünü değiştiren cihazlardır (field Inversion gel electrophoresis -FIGE). Diğeri de belirli açılarla akımın yönünü sürekli olarak değiştirebilen cihazlardır. Bu yöntemde DNA fragmentleri jel üzerinde sürekli olarak zigzag çizerek hareket ederler. Bu cihazlarla daha kısa sürede daha fazla sayıda band oluşturmak mümkündür. Ticari olarak sağlanan bu sistemlerin önemlileri; Contour-clamped Homogenous Electric Field (CHEF), Transvers alternating Field electrophoresis (TAFE) ve Rotating Gel Electrophoresis (RGE)'dir. Yüksek ayırım gücü ve yorumlanabilir sayıda fragment üretimine rağmen bu tekniğin geç sonuçlanması, pahalı enzim ve ekipmana ihtiyaç duyması ve 20'den fazla sayıdaki bandların yorumunda problem olması yöntemin kullanılabilirliğini azaltmaktadır.

2. Amplifikasyon Bazlı Yöntemler

Genotiplendirmenin bu prosedürlerinde hedef DNA önce amplifiye edilir daha sonra amplifiye ürünler ya direkt olarak veya özel RE ile hazmettirildikten sonra ortaya çıkan son ürünlerin fragment uzunluklarının analizi için agaroz jelde separe edilir. Böylece bir türün farklı suşları arasındaki fragment kalıplarındaki farklılıklar değerlendirilir. Bu yöntemler arasında en fazla kullanılanları PCR-RFLP, PCR-ribotipleme, AP-PCR/RAPD/DAF, REP-PCR ve AFLP'dir.

1. RFLP-PCR

Bu yöntemle önce kromozom üzerindeki spesifik bir gen bölgesinin amplifikasyonu yapılır, daha sonra ampikon özel REE'leri kullanarak hazmettirilir. Hazım sonunda üretilen farklı uzunluktaki parçaların dağılımı agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenir.

2. PCR-ribotipleme

Bu yöntemle önce kromozom üzerinde rRNA'yı kodlayan gen bölgesi amplifiye edilir. Daha sonra REE kullanılarak RFLP analizi yapılabilir. Bu yöntem tip ve sub tip tespitinde kullanılabilir.

3. Tekrarlayan ekstragenik elementlerin PCR ile amplifikasyonu (REP-PCR)

Bu yöntemle bakteri ve birçok mantar türünde kromozomun farklı bölgelerinde bulunabilen

kısa, tekrarlayan ve konservatif yapıları hedef alan kısa primerler kullanılır. Bölgelerin birbirlerine yeteri kadar yakın olmalarına bağlı olarak iki ekstragenik bölge arasında kalan bölgeler amplifiye edilir. Ampikonların sayı ve uzunlukları agaroz jelde elektroforez ile belirlenir.

4. Amplifiye fragment length polimorfizmi (AFLP)

Bu yöntemde kromozomal DNA önce açık uçla kesen 6-7 bp uzunluğundaki bir RE ile kesilir. Daha sonra RE'nin açık ucunu komplementer olarak tanıyan primerler kullanılarak hedef bağlanma veya bir başka ifade ile kesilme bölgelerinin amplifikasyonu müteakibinde fragment uzunluklarının analizi yapılır.

Bu yöntemin özellikle *C. pneumoniae*'nin oküler ve solunum yolları izolatlarının ayrıştırılmasında başarı ile kullanılabileceği bildirilmiştir.

5. Multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP - AP-PCR, RAPD ve DAF)

Bu isim AP-PCR, RAPD ve DAF gibi çok küçük farklılara sahip ancak aynı prensiple çalışan metodların tamamını içine alacak bir terim olarak önerilmiş ancak fazla kabul görmemiştir. Bu yöntemlerin hepsinde hedef DNA hakkında ön bilgiye ihtiyaç yoktur ve kullanılan primerlerde random olarak hazırlanır. Yine düşük "annealing" ısının kullanıldığı bu yöntemlerde primerlerin uzunluğu yöntemlerin adının farklı anılmasına neden olmuştur. Mesela AP-PCR'da kullanılan primerler klasik PCR'dakine benzer olarak 18-24 bp olarak düzenlenmişken, RAPD'da kullanılan primerler 8-10 bp, DNA amplifikasyon Fingerprinting (DAF)'te 4-5 bp uzunluğunda dizayn edilirler. Bu yöntemlerde ilk olarak kromozomal DNA ekstrakte ve pürifiye edilir. Daha sonra denatüre edilen DNA random primer/primerler kullanılarak amplifiye edilir. İlk siklusta kalıp primer kromozom üzerindeki komplementeri ile birleşir. Primerlerin random olması sebebiyle birleşmenin spesifitesini azaltmak için düşük annealing ısısı kullanılır. Bu sebeple teorik olarak daha etkili veya çok sayıda birleşmenin olabilmesi için daha uzun primerlerin kullanılması yararlı olacaktır.

Bilindiği gibi uzamanın oluşumu primerin 3'ucu ile kalıba bağlanması ile başlar ve bu uçla tutunabilen primer düşük ısıda uzamayı sağlayabilir. Uzun primerlerle 5'ucu veya ortada herhangi bir bölgenin kalıp ile birleşmesine bakılmak-

sızın daha fazla sayıda bağlanma ve farklı uzunlukta fragman oluşumu sağlanabilir. Çalışmada kullanılacak primerlerin uzunluğu, dizaynı ve sayısı da tamamen deneme yanılma yöntemi ile belirlenir. Mesela *S. aureus* ve *E. faecium* için 18-20 bp uzunluğundaki primerler kullanışlı bulunmuşken *Candida* türleri için 10 bp uzunluğundaki primer veya primerler daha uygun bulunmuştur. İşte böyle random primerlerle yapılan amplifikasyon sonrası üretilen amplikonların sayı ve uzunluklarının agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak fragment uzunluklarına göre separe edilmeleri sonucu oluşan kalıplar tiplerede kriter olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler klasik PCR teknikleri kadar kolay, hızlı ve kullanılabilir sonuçlar üretirler. Ekstra alet ve reagent ihtiyacı duymadan küçük modifikasyonlarla bütün mikroorganizma grupları için uygulanabilmesi kullanım alanını genişletmektedir. Ancak bu yöntemlerin de önemli dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan en önemli ve kapsamlısı standardizasyonsuzluktur. DNA'nın hazırlanışında ve konsantrasyonunda, kullanılan primer veya primerlerin seçiminde, polimerazın tür ve konsantrasyonunda, kullanılan termal döngü cihazı ve jelin kalitesinde, sayısında ve nihayet boya giderme işlemlerinin yapıp yapılmamasındaki değişkenlikler yani standardizasyonsuzluklar sonuçların değişkenliğini yaratmaktadır. Yine personelin bilgi ve tecrübesi ile üretilen bandların yorumlanması sonuçları etkilemektedir. DNA fragmentlerinin uzunluklarına göre agaroz jeldeki oluşturdukları band paternlerini kriter olarak alan bütün yöntemler için önemli bir genel problem de kaç banttaki farklılığın gerçek anlamda klonal farklılığı yansıttığının belirlenmesidir. İşte bu sorunun cevabı henüz tam olarak verilememiştir. Şüphesiz ki üretilen toplam band sayısına göre her bandın önemi değişiklik arz etmektedir. Fakat kabaca 1 farklı band nokta mutasyonları 2, 3, band aynı tür içerisindeki delezyon veya insersiyonları şeklinde yorumlanabilir. Ancak 4 ve üzerindeki farklı bandın oluşumu gerçek anlamda klonal farkı yansıtmaktadır. Yani güvenilir bir standardizasyonun yokluğu yorumları da kişiselleştirmektedir. Bu mahsurları ortadan kaldırılabilmek veya en aza indirebilmek için örneklerin topluca bir kerede aynı şartlar altında değerlendirilmesi önerilebilir.

Yukarıda sayılan bazı olumsuzluklara rağmen moleküler biyolojik genotipleme yöntemleri hızla fenotipik tiplendirme yöntemlerinin yerini almaktadır.

KLİNİK UYGULAMALAR

Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemleri özellikle kandidalar, aspergilluslar, lejionellalar, ve enterokoklar gibi fenotipik yöntemlerle tiplendirilmeleri zor olan mikroorganizmaların tiplendirilebilmesinde büyük avantajlar yaratmıştır. Kandidalar sıklıkla tabiatта toprak ve gıdalardan, hastane ortamında hava ve çevresel örneklerden ve hastaya ait klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmalardır. Deri ve gastrointestinal sistemde floranın üyesi olarak da görürlür. Hastane infeksiyonlarında gittikçe artan bir öneme sahip olan kandidalar immün sistemi baskılanmış kişilerde, yoğun bakım ünitelerinde ve postoperatif bakım ünitelerinde izlenen hastalarda sıklıkla ciddi infeksiyonlara yol açabilmektedir. Klinik örneklerdeki kandida izolatlarının infeksiyonları mı yoksa kolonizasyonu mu gösterdiğini anlamak zordur. Çünkü klasik fenotipik özelliklere dayalı tiplendirme yöntemleri ile klonal farklılıkları göstermek imkansızdır. Ancak RFLP parmakizi yöntemi ve ribotipleme yöntemlerinin kullanılması ile kandidaların klonal tanımlamaları yapılabilmektedir. RFLP ile kandidaların 4 genotipi olduğu, ribotipleme ile de suşlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konabileceği gösterilmiştir. Yine mitokondrial DNA-RFLP analizi tür bazında tiplerede yararlı bulunmuştur.

Bir diğer önemli kullanım alanı bulan mikroorganizma grubu da enterokoklardır. Bu bakteriler de fenotipik özelliklerine göre epidemiyolojik anlamda tiplendirilemezler. Oysa enterokoklar yalnız hastanelerde baktereminin önemli bir etkeni olma özellikleri ile değil aynı zamanda transfer edilebilir çoklu ilaç direncini kodlayan gen veya plazmidleri taşımaları ile de hastane infeksiyonlarında izlenmesi gereken önemli mikroorganizmalardır. Enterokoklar yetişkinlerin çoğunda dışkıda bulunur. Penisillin ve sefalosporinlere nispeten dirençli aminoglikozidler ve linkozamidlere karşı da düşük derecede intrinsik direnç gösterirler. Bu direnç profili mikroorganizmalar arasında süratle yayılma eğilimindedir. Vankomisin dirençli enterokok suşları ilk olarak 1986 yılında izole edilmiş ve kısa sürede tüm Avrupa ve Amerika'ya yayılmıştır. Moleküler tiplendirme teknikleri kullanılarak dirençli enterokoklarla oluşan infeksiyonların insidansında artış olduğu gösterilmiştir. Bu infeksiyonlar, bir atadan gelen klonal yayılıma bağlı olabileceği gibi, suşlar arasında plazmidle aktarılan direnci

veya antibiyotik baskısı altındaki hastalarda seleksiyonla endojen dirençli suşların yaratılmış olabileceğini de düşündürür. Bu üç halde de enfeksiyonun kontrolü için geliştirilecek stratejiler birbirinden oldukça farklıdır. Bu sebeble moleküler tiplendirme dirençli enterokokların araştırılmasında, dağılımının önlenmesinde veya kontrolünde son derece önemlidir. Buna karşılık fenotipik metodların da tamamen yetersiz olduğunu söylemek mümkün değildir. Mesela MRSA'ların tanımlanmasında disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık kalıplarının tespiti RFLP ve ribotipleme gibi bu amaç için kullanılması önerilen yöntemlerin hepsinden daha etkili ayırım yeteneği göstermiştir. Her ne kadar moleküler biyolojik tiplendirme yöntemleri gelişmiş laboratuvarlarda süratle fenotipik metodların yerini alıyorsa da unutulmamalıdır ki hiçbir "bir" tek başına mükemmel değildir. Gerekli olan yöntemler, gerekli oldukları yerlerde kullanılmalı ve ihtiyaç olduğunda yan testlerle desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Debast SB, Meis J FMG, Melchers WJG, Voss A. Use of interrepeat PCR fingerprinting to investigate an *A. baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 1996;28:577-81.
2. Engleberg NC. Molecular methods: Applications for clinical infectious diseases. *Ann Emerg Med* 1994;24:490-502.

3. Hall LMC. Are point mutations or DNA rearrangements responsible for the restriction fragment length polymorphisms taht are used to type bacteria. *Microbiology* 1994;140:197-204.
4. Louie M, Simor AE, Rachlis A, Louie L. Nosocomial *Neisseria meningitidis*: Molecular analysis of a clinical problem. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:203-4.
5. Low DE, Mc Geer A. The use of molecular biology techniques for diagnostic microbiology and hospital epidemiology. *New Horizons* 3:2, 161-69.
6. Obayashi Y, Fujita J, Ichiyama S, et al. Investigation of nosocomial infection caused by arbekacin-resistant methicillin resistant *S. aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:53-9.
7. Pfaller MA, Herwaldt LA. The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance and new technology. *Clin Infect Dis* 1997;25:258-70.
8. Power EGM. RAPD typing in microbiology-a technical review. *Hosp Infect* 1996;34:247-65.
9. Prosser JI. Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. *Microbiology* 1994;140:5-17.
10. Struelens Marc J, Gheldre YD, Deplano A. Comparative and library epidemiological typing systems outbreak investigations versus surveillance systems. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:565-9.

YAZIŞMA ADRESİ:

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı
Balcalı - ADANA

FEMS Symposium

Laboratory Monitoring of Viral Infections and Antiviral Resistance Detection

The Marmara Hotel
June 10-13, 2000, İstanbul

Congress Secretariat

Prof. Dr. Gülden YILMAZ, M.D.

Department of Microbiology and Clinical Microbiology Istanbul Faculty of Medicine
Çapa 34390 İstanbul, TURKEY

Phone: + 90212 631 18 78, Fax: + 90212 635 11 86, + 90212 635 25 82

E-mail: ercuyilmaz@superonline.com