



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI PATOJEN BAKTERİLERİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLER İLE TANIMLANMASI**

SEDA GÜVENÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2012



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI PATOJEN BAKTERİLERİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLER İLE TANIMLANMASI

Danışman: Doç. Dr. Mustafa GÜL

SEDA GÜVENÇ

Bu tez
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2012

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Seda GÜVENÇ tarafından hazırlanan **BAZI PATOJEN BAKTERİLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE TANIMLANMASI** adlı bu tez, jürimiz tarafından 10 / 07 / 2012 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa GÜL (Danışman)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. İsmail AKYOL (ÜYE)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Ekrem KİREÇÇİ (ÜYE)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. M. Akif KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Seda GÜVENÇ

Bu çalışma K.S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2011\ 3-7 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

BAZI PATOJEN BAKTERİLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE TANIMLANMASI

ÖZET

Tıpta tüm tanı laboratuvarı disiplinlerinde amaç, en uygun testi uygulamaktır. Özellikle enfeksiyon hastalıklarının tanısında etkenin kısa sürede tespit edilmesi, bir defada çok sayıda mikroorganizmanın saptanabilmesi, birden fazla hastanın aynı anda çalışılabilmesi ve tedavisine olabildiğince erken başlanılabilmesi gittikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Bu etkenlerin kısa sürede tanımlanması, hem mortaliteyi ve bulaş riskini azaltmakta, hemde kontrolsüz ilaç kullanımını azaltarak maliyeti düşürmektedir. Bu çalışmada moleküler yöntemlerden biri olan multiplex PCR kullanılarak *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin kısa süre de tanımlanmaları amaçlanmıştır.

PCR ile birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması çoklu (multipleks) PCR olarak adlandırılır. Multiplex PCR Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir. Fakat her reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır. Çalışmamızda laboratuvarımızda Vitek II cihazıyla tanımladığımız *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri kullanılmıştır. Multipleks PCR'da bu bakterilerin 16 S RNA gen bölgesinden büyüklüğü sırasıyla 407,400, 254 ve 249 bp arasında değişen parçaları amplifiye eden *spy1258*, *mecA*, *aggR* ve *oprI* spesifik primerleri kullanılmıştır.

Bu bölgedeki genler amplifiye edildikten sonra görüntülenmiştir. Bunun sonucunda konvansiyonel yöntemlerle laboratuvar tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmaların çeşitli biyolojik sıvılardan kısa sürede tanımlamak için elverişli olduğu gösterilmiştir. Gelecekte maliyetlerin azaltılması ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte, moleküler yöntemlerin kullanım alanlarının artacağını ve konvansiyonel yöntemlerin birçoğunun yerini alacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Moleküler metotlar, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Multipleks PCR

SOME PATHOGENIC BACTERIA WITH IDENTIFICATION OF MOLECULAR METHODS

SUMMARY

In purposes of all disciplines diagnostic laboratory medicine, the most appropriate test to apply. Especially, factor in the diagnosis of infectious diseases to be detected as soon as possible, at a time, detection of a large number of microorganisms, can be run more than one patient at the same time and begin treatment as early as possible is becoming more and more important. Identification of these factors, the short period of time, both mortality and reducing the risk of transmission and by reducing the uncontrolled use of drugs lowers costs. In this study, which is one of the molecular methods using multiplex PCR of *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in a short period of time is intended to describe.

With the reproduction of more than one target sequence by PCR, multiplex PCR is called. Multiplex PCR with conventional PCR performed the same steps However, multiple primer sets used in each reaction. In our study we were used, defined to *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria by Vitek II device in our laboratory. For Multiplex PCR, respectively, the size of these bacteria 407.400 16 S RNA gene region, which amplified fragments of 254 and 249 bp, spy1258, mecA, and oprI AggR specific primers were used

After amplification of the genes in this region is viewed. As a result, laboratory diagnosis of conventional methods which are time-consuming and laborious, microorganisms such as *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, from various biological fluids, aimed to demonstrate that convenient to define in a short period of time. with the reduction of costs and the development of technology in the future, we think, will increase of uses areas of molecular methods and take replace of the many conventional methods.

Key words: Molecular methods, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Multiplex PCR

TEŞEKKÜR

Araştırma konusunun seiminden değerlendirmesine kadar yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve aynı zamanda alışmalarımı yürüttüğüm yer olan Üniversite-Sanayi-Kamu İşbirliği Geliřtirme Uygulama ve Araştırma Merkezi' (ÜSKİM) nin olanaklarından yararlanmamı sağlayan danışman hocam Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mustafa GÜL'e, çalışmalarım da yardımlarını esirgemeyen ÜSKİM müdür yardımcısı Ziraat Fakóltesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı Doç. Dr. İsmail AKYOL' a, tez süresince yardımlarını esirgemediği gibi hayatım boyunca yanımda olacağına inandığım değerli araştırma görevlisi Abdullah KARADAĖ 'a yüksek lisans çalışmalarım da her zaman bana destek olan aileme ve emeği geçen tüm öğrenci arkadaşlarıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

SEDA GÜVENÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Özet.....	I
SUMMARY	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Streptococcus pyogenes</i> :.....	2
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.3. <i>Escherichia coli</i>	10
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR).....	16
2.1. PCR' da DNA replikasyonu	17
2.1.1. 1-Denatürasyon.....	17
2.1.2. 2-Annealing (Hibridizasyon: Primer Bağlanması- Birleşme safhası).....	18
2.1.3. 3-Polimerizasyon Extension (Çift İplikli DNA Sentezi- Uzama safhası).....	18
2.1.4. Polimeraz Zincir Tepkimesinin Bileşenleri.....	19

2.1.4.1.	Enzim.....	19
2.1.4.2.	Deoksinükleotit Trifosfatları	20
2.1.4.3.	Magnezyum Derişimi	20
2.1.4.4.	Tampon İçeriği	21
2.1.4.5.	Oligonükleotidler (Primer)	21
2.1.4.6.	Hedef Diziler	21
2.1.4.7.	Isılar ve Döngü Sayısı	22
2.1.4.8.	PCR Engelleyicileri (İnhibitörleri) ve Artırıcıları	22
2.2.	PCR’da Kontaminasyondan Korumak için Alınabilecek Önlemler	23
2.3.	PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi	23
2.4.	PCR Optimizasyonu ve PCR ile Doğru Ürünün Çoğaltılması	24
2.4.1.	Magnezyum İyonları.....	24
2.4.2.	Taq DNA polimeraz konsantrasyonu	25
2.5.	Multiplex PCR.....	25
2.6.	PCR katkı maddeleri.....	26
3.	ÖNCEKİ ÇALIşMALAR	27
4.	MATERYAL VE METOT	29
4.1.	Kimyasallar.....	29
4.2.	Bakteriler	29
4.3.	Metot.....	29
4.4.	Primerler	30
4.5.	Multipleks PCR	31

4.6. DNA'nın Jel Elektroforezi.....	31
5. BULGULAR	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
7. REFERANSLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Kanlı besiyerinde <i>Streptococcus pyogenes</i>	3
Şekil 1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ' mannitol fermantasyonu	7
Şekil 1.3. <i>Escherichia coli</i> ' nin EMB agardır metalik röfle veren görüntüsü.....	11
Şekil 1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın besiyerlerindeki görüntüsü	14
Şekil 2.1. DNA'nın Replikasyonu	16
Şekil 2.2. Primerlerin Kalıp DNA'ya bağlanması.....	18
Şekil 3.1. Agarozun hassas terazide tartımı ve mikrodalga fırında eritilmesi.....	31
Şekil 3.2. Reaksiyon karışımının hazırlanması	33
Şekil 3.3. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi.....	34
Şekil 3.4. Yatay agaroz jel elektroforezi düzeneği	34
Şekil 4.1. <i>Streptococcus pyogenes</i> PCR daki görüntüsü	35
Şekil 4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> PCR daki görüntüsü.....	36
Şekil 4.3. PCR da her bakteri için oluşan görüntüler.	37
Şekil 4.4. PCR da her bakteri için oluşan görüntüler.	37
Şekil 4.5. <i>Escherichia coli</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın PCR daki görüntüleri.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1 . <i>Escherichia coli</i> biyokimyasal özellikleri.....	12
Çizelge 1.2. <i>Escherichia coli</i> suşlarının klasifikasyonu.....	13
Çizelge 3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterilerinin tanımlanması için tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri.	30

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pyogenes</i>	: <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>P.aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
RNA	: Ribonükleikasit
cm	: Santimetre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ng	:Nanogram
mM	: Milimol
bp	: Baz Pair
GABS	: A grubu beta hemolitik streptokok
EMB besiyeri	: Eosin Metilen Blue besiyeri
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
kb	: Kilo Baz

GİRİŞ

Klinikte, daha önce adı konamamış enfeksiyon hastalıklarının ortaya çıkması veya tanımlanan enfeksiyon hastalıklarının insanlarda tekrardan hastalık oluşturmasıyla beraber toplum sağlığının olumsuz yönde etkilenmesi önemli sıkıntılar oluşturur. Bakterilerin tanımlanmaları genellikle kültür ortamlarında üretilmeleriyle yapılmaktadır. Kültür ortamlarında çoğalan bakterilerin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri gibi fenotipik karakterleri bakterilerin belirli bir tür veya cins düzeyinde tanısına olanak vermektedir. Patojen bakterilerin kültür ortamında üretilmemesi ya da üretilmesinde zorlanma, patojen mikroorganizmaların kültürde üretilmesinin uzun zaman alması tedavi sürecini olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca bir organizmaya ait bazı fenotipik karakterlerin laboratuvar koşullarına bağlı olarak değişebilmesi ya da belirli bir fenotipik karakterin birçok değişken gen tarafından oluşturulması ve de genetik olarak farklı organizmalar tek bir mikroorganizma olarak tanımlanabilmesi karşılaşılan diğer zorluklardır (Relman ve Persing, 1996).

Fenotipik tanıda ortaya çıkan bu sorunlar insanları daha güvenilir bir yöntem olan PCR' ve daha birçok moleküler yöntemi mikrobiyolojide kullanmaya teşvik etmiştir. PCR teknolojisinin mikrobiyolojide yaygın olarak kullanıldığı alanlar; antibiyotik almış olan hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma, antimikrobiyal direncin saptanması, bulaşıcı patojenlerin ve kültürü yapılamayan bakterilerin erken tanısı, genotiplendirme ve dirençlilik ile bakterilerin toksijenik suşlarının ayırt edilmesin şeklinde özetlenebilir. Özellikle klinik örneklerde PCR metodunun duyarlılığı bulaşıcı bakteri hücrelerinin sayısının çok düşük olabildiği, materyallerin çoğu türünde bakteriyel ürünleri veya bakterinin düşük konsantrasyonlarının doğrudan bulunmasını sağlar. Bu sebeple patojenlerin moleküler izlenmesi, organizmaların bulunması ve de belirlenebilmesi için hızlı ve güvenilir bir metot olan PCR 'a gereksinim duyulmaktadır.

Bakteriler zamanla antibiyotiklere karşı direnç geliştirmekte, bu durum, hem hasta hem de hekim açısından bazı sorunları beraberinde getirmektedir. Antimikrobiyal dirençteki artış, kişilerin tedavi süresini ve hastanede yatış süresini uzatarak, mortalite oranlarını artırmakta, geniş spektrumlu ve daha pahalı olan antibiyotik kullanımına neden olmaktadır (Murray, 1991; Jacoby, 1991). Komplikasyon ve mortalite oranları yüksek olan böyle dirençli enfeksiyonlarda mortalite oranı, tanı konulduktan sonra uygun

antibiyotiklerle tedavi edilmesiyle azalmaktadır. Bu enfeksiyonlara uygun tedavi kısa sürede verilmeye başlanmadığında mortalite oranı artmakta, hastane yatış süresi uzamakta ve buna paralel olarak ta maliyet yükselmektedir. Bu yüzden enfeksiyon etkeninin kısa sürede identifiye edilmesi önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada Multiplex PCR yönteminin çok daha kısa sürede birden fazla bakterinin (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) identifiye edilmesine olanak sağladığı gösterilmiştir. Bu yöntem kullanılarak mortalitenin, hastanedeki yatış süresinin ve maliyetin azaltılabileceğini göstermek amaçlanmıştır.

1.1. *Streptococcus pyogenes*

İlk kez 1874'te Billroth yara ve erizepel lezyonlarının cerahatli eksudalarında zincir yaparak üreyen kokları tanımlamış ve *streptococcus* adını vermiştir. 1879'da Pasteur tarafından puerperal sepsisli bir hastanın kanından elde edilmiştir. Ogston tarafından 1881'de cerahat etkeni olduğu açıklanmıştır. Bakteriyi 1882-1883' de ilk kez saf kültür olarak Fehleisen üretmiş daha sonra 1884'te Rosenbach "*Streptococcus pyogenes*" isimlendirmesini yapmıştır. 1919'da Brown, kanlı agardaki hemolitik aktivitelere göre streptokokları alfa, beta, ve gama olarak ayırmıştır. Rebecca Lancefield, presipitasyon ve Griffith ise aglütinasyon yöntemleriyle streptokokların immunolojisini incelemişler ve Lancefield 1933'de patojen streptokokları, hücre duvarında bulunan karbonhidrat antijenlerine göre serolojik gruplara ayırmıştır (Ustaçelebi,1999).

Grup A antijeni taşıyan çoğu streptokok *Streptococcus pyogenes*'tir. *S. pyogenes* (*Streptococcus pyogenes*) önemli bir insan patojenidir. *S. pyogenes* lokal veya sistemik invazyon yapan ve poststreptotoksik immünolojik bozukluklara yol açan majör bir insan patojenidir. Tipik olarak 0.5 mm çaplı kolonilerinin etrafında büyük (1 cm çaplı) bir beta hemoliz zonu vardır (Şekil 1.1.). PYR (L- pirolidonil- 2-naftilamit hidrolizi) pozitifdir ve basitrasine duyarlıdır. Küresel veya oval olan hücreler zincir şeklinde dizilir.



Şekil 1.1. Kanlı besiyerinde *Streptococcus pyogenes*

Streptokoklar gram pozitif olmakla birlikte kültürleri eskidikçe ve bakteri hücreleri öldüğünde Gram negatif gibi görülebilirler. Bu durum bazı streptokoklarda bir gecelik inkübasyon sonrasında bile olabilir. Grup A suşlarının çoğu hiyaluronik asit içeren kapsül yapmakta ve bu kapsül fagositozu önlemektedir. *S. pyogenes* hücre duvarında proteinler (M, R, T antijenler), karbonhidratlar (gruba özgül) ve peptidoglikan içerir. Pilluslar grup A streptokokun kapsülünden dışarıya doğru uzanır; kısmen M proteininden oluşur ve lipoteikoik asit ile örtülüdür. Lipoteikoik asit streptokokun epitelyum hücrelerine tutunmasında önemlidir. Üreme ve hemoliz %10 CO₂'li ortamda artar. Çoğu patojen hemolitik streptokok en iyi 37° C'de ürer. Genelde fakültatif anaeropturlar ve hem aerop, hem de anaerop ortamda üreyebilirler. Peptostreptokoklar zorunlu anaeropturlar. *S. pyogenes* invazyonuna bağlı hastalıklar erizepel, selülit, nekrotizan fasiit (streptokoksik gangren), loğusa ateşi ve sepsis'tir. *S. pyogenes* tarafından 20'den fazla ekstraselüler madde salınır. Bunlar arasında en önemlileri streptokinaz, streptodornaz, hiyaluridaz, pirojenik ekzotoksinler, difosforidin nükleotidaz ve hemolizinlerdir. *S. pyogenes* suşlarının tümü penisiline, çoğu eritromisine duyarlıdır. Bazıları tetrasikline dirençli olabilir. Öte yandan, akut streptokok enfeksiyonunda bakterileri hızla eradike etmek, antijenik uyarıyı kesmek ve post streptotoksik hastalıkları önlemek için her tür çaba harcanmalıdır. 10 gün

boyunca etkin doku düzeyleri sağlandığı takdirde penisilin veya eritromisin ile bu başarılabılır (Karadenizli, 2003).

S. pyogenes (A grubu beta hemolitik streptokok) enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçilmesi gereken ilaç penisilindir. Çünkü hem ucuz, hem güvenilirdir. Ayrıca bugüne kadar penisiline dirençli *S. pyogenes* kökeni bildirilmemiştir. Penisilin alerjisi olanlarda ikinci seçenek olarak eritromisin kullanılmaktadır. Ancak başta Avrupa ülkeleri olmak üzere birçok ülkede eritromisin ve diğer makrolitlere karşı yüksek oranda direnç bildirilmektedir (Kobayashi, 2005). Fusidik asitin keşfinden sonra Gram pozitif bakterilere etkinliği olan birçok antibakteriyel ilacın keşfedilmesi, fusidik asite olan ilgiyi azaltmıştır. Ayrıca eritromisine dirençli ilk *S.pyogenes* izolatı 1959 yılında tespit edilmiş ve her geçen yıl dirençli suş sayısında artış gözlenmiştir (Karadenizli, 2003).

Romatizmal ateş hastasında grup A beta hemolitik streptokokla (GABHS) reenfeksiyonun önlenmesinde de antibiyotiklerin yararı büyüktür. İnsanda *S. pyogenes*'in nazofarinkste veya perinede asemptomatik taşıyıcılığı olabildiği halde, kültür veya diğer bir yöntemle *S. pyogenes* saptandığı zaman patojen muamelesi görmelidir. GABHS' un temel kaynağı bu mikroorganizmayı taşıyan insandır. Kaynak durumundaki insan klinik veya subklinik enfeksiyon şeklinde ya da taşıyıcı olarak solunum sisteminden ya da derisinden yayılan damlacıklar yoluyla diğer insanlara bulaştırırlar. Diğer birçok streptokok (viridans streptokok, enterokok, vb) insan normal florasının elemanlarıdır. Normalde bulunmaları gereken yerin dışındaki bir bölgeye geçtikleri zaman hastalık yapabilirler. Bunu önlemek için özellikle solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve üriner sistem cerrahi girişimlerinde geçici bakteriyemi oluşma riskine karşı, kalp kapak deformitesi veya protez kapağı ya da eklem protezi olan kişilere profilaktik anbiyotik uygulanmalıdır (Karadenizli, 2003).

GABHS için doğal kaynak insandır. Ayrıca, kişiden kişiye bulaş solunum yoluyla olur. Bu bakteriler Streptokokal faranjitin en sık nedenidirler. Çoğu olgu okul çağı çocuklarında 5–15 yaş arasında görülür ve inkübasyon periyodu 2–4 gündür. Genellikle ateş, boğaz ve baş ağrısı, halsizlik ve karın ağrısı ile ani olarak başlar. GABHS faranjitinin peritonsiller ve retrofarigeal abse, süperatif servikal adenit, otitis media, sinüzit, mastit ve bakteremi gibi süperatif ya da akut ya da kronik romatizmal ateş, glomerulonefrit gibi non-süperatif komplikasyonları olabilir (Winn, 2006).

GABHS'ların farinksdeki kolonizasyonları aktif enfeksiyona neden olabileceği gibi, asemptomatik taşıyıcılıkla da sonuçlanabilir. Mikroorganizmanın virulans faktörleri invaziv hastalık oluşmasında önemlidir. Bununla beraber taşıyıcılığa neden olan özellikler tam olarak açıklanamamıştır. Ancak genel olarak GABHS tonsillofaranjiti geçiren kişilerin düşük miktarda doz ve/veya yetersiz süre tedavi alması, boğaz florası bakterileri tarafından beta-laktamaz salgılanması sonucunda tedavi için verilen penisilinlerin parçalanması, antibiyotiğe tolerans gelişmesi gibi sebepler sayılmaktadır (Arda, 2003).

Taşıyıcılarda akut romatizmal ateş gelişimi ve enfeksiyonun başka bir kişiye bulaşma riski düşük orandadır. GABHS ile tonsillofaranjit geçiren kişilerle teması olanlara boğaz kültürü yapılması ve tedavi verilmesi önerilmemektedir. Ancak sık enfeksiyon geçirenler ve nonsüpüratif komplikasyon riskinin yüksek olduğu kişiler bunun dışındadır (Arda, 2003; Martin, 2004). Bununla birlikte, literatürde, taşıyıcılığın viral enfeksiyon olasılığını arttırdığı ve streptokokkal tonsillofarenjit salgınlarına yol açabileceğini bildiren ve tedavi edilmesi gerektiğini savunan çalışmalar da mevcuttur (Pichichero, 1999; Martin, 2004).

1.2. *Staphylococcus aureus*

İlk kez 1880 de *Staphylococcus* adı Ogston tarafından kullanılmıştır. *Staphylococcus* Yunanca “üzüm salkımı” anlamına gelen “staphyle” teriminden gelmektedir (Murray ve ark., 1998). Daha sonra ilk kez Rosenbach (1884) tarafından hastalık örneklerinden izole edilmiştir (Bilgehan, 1990; Kloos and Bannerman, 1995).

Önemli bir enfeksiyon etkeni olan *Staphylococcus* cinsi bakteriler *Micrococcaceae* ailesine aittir. İnsanda en sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilen Stafilokoklar; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus*'dur. Bu türler içerisinde *Staphylococcus aureus* en fazla enfeksiyon sebebi olan bakteridir. Klinik önemi olan bu üç bakterinin ayırımında koagülaz enzimi oluşturma özelliğinin yanı sıra; hemoliz özelliği, mannitol fermentasyonu ile asit oluşumu, DNaz varlığı, anaerobik ortamda üreme ve pigment oluşumu gibi bazı biyokimyasal testler yapılmaktadır.

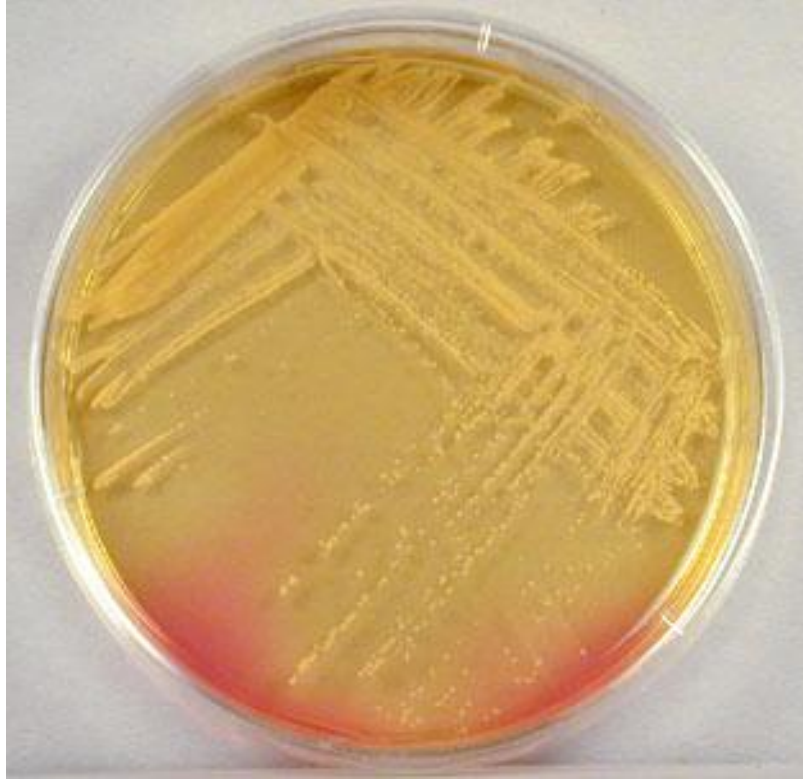
S. aureus (*Staphylococcus aureus*) stafilokoklar arasındaki en patojen türdür ve pek çok klinik tablodan sorumlu olabilir. Toplum veya hastane kaynaklı oluşuna göre klinik

formu, morbidite ve mortalitesi yönünden farklılık gösterir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, septik artrit, yara enfeksiyonu, osteomyelit pnömoni, ampiyem, endokardit, bakteriyeminin yanısıra, toksin etkisi ile besin zehirlenmesinden toksik şok sendromuna kadar değişebilen hastalık tablolarına yol açabilir (Waldvogel, 2000; Ünal, 2004)

Stafilokoklar üremeleri esnasında bölünebilme özelliklerinden dolayı mikroskopta çoğunlukla düzensiz kümeler halinde görülürler. Küme görüntüsü bu bakterilerin katı besiyerlerinde üremesi sonucu mikroskopik olarak gözlemlenebilir. Morfolojik özellikleri pürülan materyal içerisinde, infekte vücut sıvılarında veya sıvı besiyerlerinde değişebilir. Genel özellikleri yuvarlak, 0.5 - 1.5 µm çapında, gram pozitif, katalaz pozitif, fakültatif anaerop (yalnız *S. saccharolyticus* anaerop) fakat genellikle aerop üremeyi seven, hareketsiz, % 10 NaCl' lü ortamda ve 18 - 40° C ler arasında üreme özelliğine sahip kok formunda mikroorganizmalardır (Sekil 1.2). *S.aureus* Koagülaz pozitif tek stafilokoktur. Diğer stafilokoklar “koagülaz negatif stafilokoklar (KNS)” olarak gruplandırılır (Bilgehan, 1990; Kloos ve Bannerman, 1995; Koneman ve ark., 1997; Wilkinson, 1997).

Fakültatif anaerop bir bakteri olan *S. aureus* basit besiyerleri dahil bir çok besiyerinde üreyebilmelerine karşın kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar. En iyi 37° C'de ve pH 7,4'de ürerler. Çoğu suşu koyun, at ve insan kanı bulunan agar besiyerinde 24-36 saatlik inkübasyon sonunda tam hemoliz oluşturur. Kanlı agarda altın sarısı renginde, yuvarlak, 1-3 mm çapında düzgün kenarlı koloniler oluşturur. Kolonilere altın sarısı rengini veren karotenoid pigmentlerdir (Bilgehan,1990; Tünger ve ark., 2003).

Mannitol tuz agar yüksek tuz konsantrasyonu içerdiğinden stafilokoklar için seçicidir. Mannitol fermantasyonuyla oluşan asit, ph göstergesi fenol kırmızısının kırmızı (alkalin) ve sarıya (asit) dönmesine neden olur (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. *S. aureus* mannitol fermantasyonu

S. aureus çeşitli disakkaritleri, heksozları, pentozları şeker alkollerini fermente ederek bol miktarda laktik asit oluşturur. *S. aureus* için Mannitol'ün fermantasyonu ayırt edici bir özelliktir, bir çok karbonhidratı enerji kaynağı olarak kullanabilir ve aerop koşullarda daha iyi ürer. Karbondioksit ve asetat aerobik glikoz kullanımı ile ortaya çıkan ürünlerdir. % 10 ve daha az NaCl içeren ortamlarda iyi, % 15 NaCl 'lü ortamda zayıf ürerler (Bilgehan, 1990).

Hücre duvarı, mikoplazmalar dışındaki tüm prokaryotlarda bulunur. Bakteriye şekil veren ve hücre içi osmotik basınca karşı hücreyi koruyan sağlam bir yapıdır (Davis ve ark., 1990). Bütün gram olumlu bakterilerdeki gibi stafilokoklarında hücre duvarı teikoik asit ve peptidoglikan içerir. Hücre duvarının esas yapısını oluşturan Peptidoglikan, hem gram olumlu hem de gram olumsuz bakterilerde bulunan karmaşık bir makro moleküldür. Yapısının temel taşları olan glikan zincirleri, n-asetil glukozamin ve n-asetil müramik asit birimlerinin dönüşümlü bir şekilde sıralanmaları ile oluşan disakkarit zincirleridir. Bu zincir üzerinde, müramik asidin laktil grubuna bağlı tetrapeptid yapısı bulunmaktadır. Tetrapeptidin dördüncü pozisyonundaki D-Alanin ile üçüncü pozisyonundaki diaminoasit arasında çapraz bağlar oluşur ve türler arasında bu bağların yapıları farklılık gösterir. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlığı ile ilişkili olup, *S. aureus*'da çapraz bağlantı

oranı yüksektir ve bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar (Wilkinson, 1997).

Teikoik asit fosfodiester bağlarıyla bağlı ribitol birimlerinden oluşan suda çözülebilen bir polimerdir. Yalnızca gram olumlu bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzeyine negatif yük vererek çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynar (Wilkinson, 1997). Peptidoglikan yapıya kovalent bağlarla bağlı olan teikoik asitler “duvar teikoik asitleri” diye adlandırılmaktadır. Bir kısmı ise hücre membranında bulunan lipidlerle kovalent bağlar yapmıştır ve “membran teikoik asitleri” olarak adlandırılır. Teikoik asitler, stafilokokların türe özgü antijenleridir ve ribitol teikoik asit *S.aureus* için özgüdür (Kingsbury ve Wagner, 1992).

Protein A, *S.aureus* suşunda peptidoglikana bağlanan bir yüzey proteinidir. Bu proteinin en önemli özelliği bazı immünglobulin G (IgG) alt sınıflarının (IgG1, IgG2, IgG4) Fc reseptörleri ile özgül olmayan etkileşimidir (normalde antikorlar özgün antijenleri ile Fab bölümlerinden bağlanırlar). İmmünglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanan Protein A bakteriyi antikora bağlı fagositozdan korur. Ayrıca hücre dışına salgılanan Protein A aynı reseptörlere bağlanarak komplemanın tüketimine sebep olur ve böylece bakteri komplemanın litik etkisinden korunmuş olur. Protein A, aynı zamanda bazı enfeksiyon hastalıklarında in vitro deneylerde tanı amacıyla kullanılmaktadır. Stafilokoklar bu deneylerde IgG antikorlarıyla kaplanmaktadır. Antikorların Fc kısımları ile bakteriyel Protein A bağlandığında özgül bağlanma bölgeleri olan Fab bölümleri serbest kalır. Gözlenen örnekte aranan antijen var ise stafilokoksik Protein A-antikor-antijen kompleksi oluşmakta ve aglütinasyon gözle görülür hale gelmektedir. Buna da koaglütinasyon deneyleri adı verilir (Tünger ve ark., 2003).

***Staphylococcus aureus* virülans etkeni olarak salgıladığı birçok ekstraselüler enzim ve toksin şunlardır:**

Katalaz : Tüm stafilokoklar tarafından üretilen bu enzim, fagositik hücreler tarafından stafilokokların yutulmasından sonra oluşturulan toksik hidrojen peroksit'i

yıkarak su (H₂O) ve oksijene (O₂) dönüşümünü katalizler. Bu sayede bakteri fagositoz sonrası da yaşamını sürdürür (Koneman ve ark., 1997).

Lipaz : Tüm *S.aureus*'lar ve bazı koagülaz negatif stafilokoklar tarafından salgılanan bu enzim dokuda bulunan lipit yapıyı parçalayarak bakterinin deri ve deri altı bölgelerde yayılmasını sağlar (Tünger ve ark., 2003).

Koagülaz : *S. aureus* tarafından üretilen bir plazma pıhtılaştırma proteini olan koagülaz iki tiptir. Bunlar serbest koagülaz ve bağlı koagülaz (clumping factor) dir. Serbest koagülaz plazmada "coagulase-reaction factor (CRF)" ile birleşerek trombine benzer yapıdaki "stafilotrombin"i meydana getirir. Stafilotrombin de fibrinojeni fibrine dönüştürmeyi katalizler. Bağlı koagülaz ise hücre duvarında bulunur ve doğrudan fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürebilir. Ayrıca stafilokokların kümeleşmesine neden olur ve böylece bakteri hücrelerinin etrafı fibrinle sarılır. Fibrinden oluşan bu yapı bakteriyi fagositoza karşı dirençli hale getirir (Murray ve ark., 1998; Dündar ve Dündar, 2002; Tünger ve ark., 2003).

Hyalüronidaz: *S. aureus*'ların % 90'ı tarafından üretilir. Bağ dokunun yapısında bulunan hyalüronik asidi hidrolize ederek, enfeksiyonun yayılmasını kolaylaştırır (Bilgehan, 1990; Tünger ve ark., 2003).

Deoksiribonükleaz (DNase): Birçok *S.aureus* tarafından üretilen Dnase DNA'yı hidroliz eder (Bilgehan, 1990).

Fibrinolizin (Staphylokinase): Plazmada bulunan plazminojen veya profibronizin isimli maddenin aktivasyonu ile plazmin (fibrinolizin) oluşturur. Bu madde aracılığıyla fibrinolitik etki oluşur ve fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına neden olur (Bilgehan, 1990).

β -laktamaz: β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan direncin önemli kısmından sorumlu olan enzimlerdir. β -laktam halkasındaki amid bağı parçalayarak antibiyotiği inaktive ederler. Stafilokokal β -laktamazlar başlıca penisilinleri hidrolize ederler. Genetik taşıyıcıları plazmid ve transpozonlardır (Wilkinson 1997, Murray ve ark., 1998).

Hemolizinler : *S.aureus* antijenik özellik bakımından farklı dört tip (α , β , γ , δ) hemolizin (ekzotoksin) üretir. Bu hemolizinler antijen farklılıkları dışında çeşitli hayvan

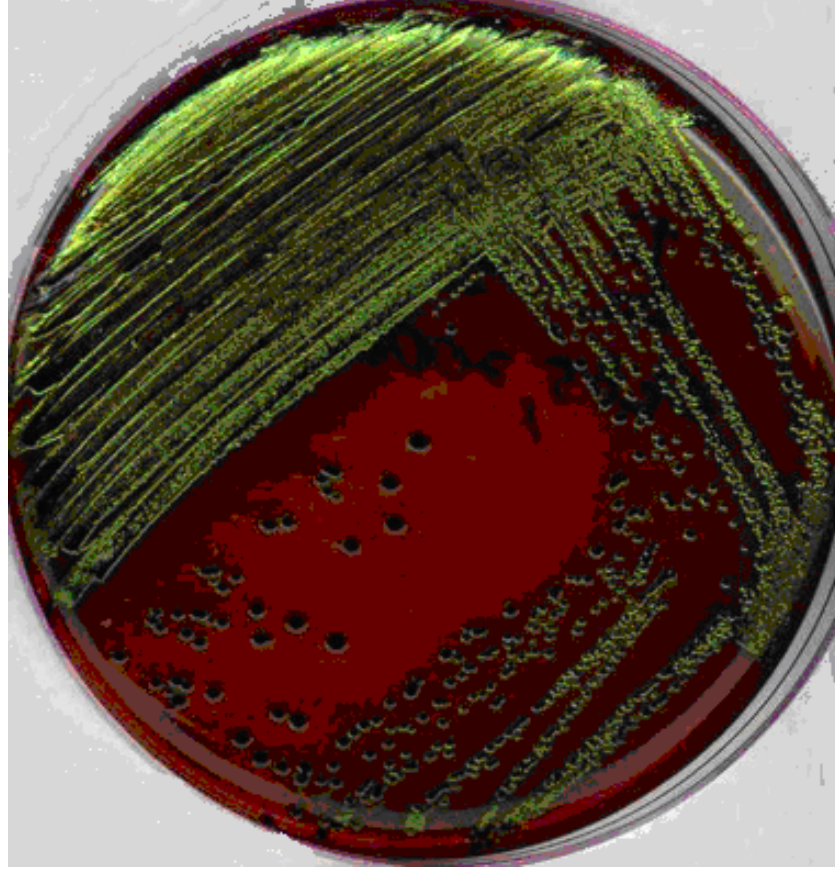
eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısıya ve zamana, toksisite derecelerine bağlı olarak farklılıklar gösterirler (Bilgehan, 1990).

1.3. *Escherichia coli*

İlk kez 1855 yılında Escherichia adında bir araştırmacı tarafından infantların dışkılarından izole edilen *Escherichia coli* *Bacterium coli* olarak adlandırılmış, sonraları izole eden kişinin adı verilmiş ve *Escherichia coli* olarak tanımlanmıştır (Baron, 1994; Bilgehan, 1992).

E. coli (*Escherichia coli*), 2-6 µm boyunda, 1-1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer alan gram negatif basildir. Kuşların ve memelilerin normal barsak florasında bulunur. Hareketleri etraflarında bulunan kirpikleri aracılığıyla olmakla beraber yavaştır ve bazı suşlarında kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır (Baron, 1994; Bilgehan 1992).

E.coli fakültatif anaerob bir bakteridir. 15-45 °C lerde üreyebilmekle birlikte optimal üreme ısıları 37 °C' dir ve ortalama pH 7-7.2'de, buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürerler. Homojen bulanıklık oluştururlar. Agarda genellikle 2-3 mm çapında düzgün kenarlı, konveks, parlak, gri-beyaz renkte S tipi koloniler yaparlar. Tekrarlanan pasajlarda ise R tipi koloniler oluştururlar. Özellikle idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen suşları kanlı agarda hemoliz yapabilirler. Kapsüllü bakteriler ise mukoid koloniler oluşturabilirler. Karbonhidratları parçalayarak asit ve gaz oluştururlar. Laktoza parçalayıp gaz oluşturmalarıyla diğer barsak bakterilerinden özellikle shigella ve salmonella'lardan ayırımında önemli bir özelliktir. Bu nedenle pratikte içinde laktoz ve bir ayıraç bulunan çeşitli besiyerleri kullanılarak laktoz negatif bakterilerden ayırt edilmesi sağlanır. McConkey ve Salmonella-Shigella (SS) agarda kırmızı koloniler oluştururlar. İçinde laktoz, sodyum sülfid,diyament füksin içeren Endo agarda ve içinde laktoz ve eozin metilen mavisi bulunan EMB agarda mavi- siyah yeşilimsi parlaklık veren koloniler oluştururlar (Şekil 1.3.). (Bilgehan, 1992; Baron, 1994; Ryan, 1994).



Şekil 1.3. *Escherichia coli*' nin EMB agarda metalik r fle veren görüntüsü

E. coli bakterileri biyokimyasal olarak triptofandan indol oluştururlar, Metil kırmızısı testleri pozitifdir, Voges Proskauer testleri negatif, sitratı kullanımları negatiftir ( izelge 1.1). Kısaca **IMVIC** (+ + – –) olarak gösterilir ve ayrıca oksidaz negatif Katalaz pozitif olup, üreyi par alayamazlar ve potasyum siyanür testi olumsuzdur. Bazı suşları hariç Hidrojen sülfür oluşturamazlar ancak sisteinli besiyerinde az miktarda H₂S yaptıkları tespit edilmiştir (Bilgehan, 1992; Baron, 1994).

Çizelge 1.1 . *Escherichia coli* biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal Testler	<i>E. coli</i>
İndol	+
Metil red	+
Voges Proskauer	-
Sitrat	-
Lizin dekarboksilaz	+
Arjinin dihidrolaz	V
ONPG	V
Fermantasyon	
Laktoz	+
Sorbitol	+*
Mannitol	+
Adonitol	-
Sellobioz	-
Sarı Pigment	-

* *E. coli* O157 suşları sorbitol negatiftir. V:Suşların %11-%89'unda pozitifdir

E. coli'nin patojenik suşları, ishale yol açan enfeksiyonlar, idrar yolları enfeksiyonları, menenjit, sepsis gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Endemik ve epidemik ishal dünyada morbidite ve mortalitenin 3 önemli nedeninden biridir ve her yıl 5 yaşın altında beş milyon çocuğun ölümüne sebep olmaktadır. WHO raporlarına göre Latin Amerika'da çocuk ölümlerinin % 20'si ishal sonucudur. Patojenik *E. coli* suşlarının da ishal vakalarında önemli bir yer tuttuğu belirtilmektedir (Franzolin ve ark. 2005, Orlandi ve ark. 2006).

İshale yol açan *E. coli* suşları, oluşturdukları enfeksiyon ve serolojik farklılıkları göz önüne alınarak beş gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar; enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), entero-agregatif *E. coli* (EAaggEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC)'dir (Çiçek, 2008)(çizelge 1.2). Ayrıca bazı araştırmacılar sigatoksijenik *E. coli*'yi de (STEC) bu gruplara dahil etmektedir (Franzolin ve ark. 2005).

Çizelge 1.2. *Escherichia coli* suşlarının klasifikasyonu

Diyarejenik <i>E.coli</i> suşlarının klasifikasyonu	Kısaltmalar	İnfeksiyonların temel semptomları
Enterotoksijenik <i>E. coli</i>	ETEC	Diyare, ileitis
enteropatojenik <i>E. coli</i>	EPEC	Diyare
Enteroinvaziv <i>E. coli</i>	EIEC	Kanlı diyare
Enteroagregatif <i>E. coli</i>	EAggEC	Diyare
Enterohemorajik <i>E. coli</i>	EHEC	Diyare, HC, HUS, TTP

Hemorajik kolit(HC), Hemorajik Üremik Sendrom (HUS), Trombositik Trombositopenik Purpura (TTP)

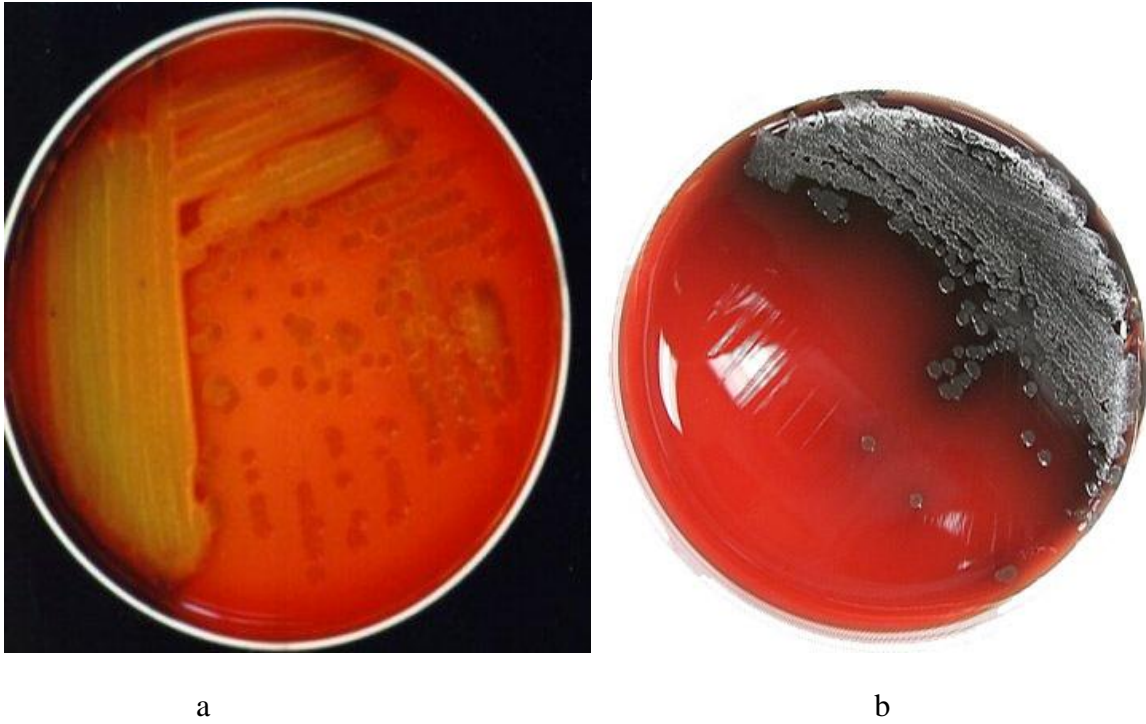
1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Bu bakteri 1850'de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmış önce *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. 1862'de Piyosiyanin izolasyonu Lucke tarafından yapılmıştır (Aydın, 2001).

1882'de Fransız eczacı Carle Gessard, yara akıntılarındaki mavi ve yeşil pigmentlere Pasteur'un kültür yöntemlerini uygulayarak *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*)'yı saf olarak izole etmiştir. 1886 yılında Finkelstein adlı araştırmacı antemortem bir çocukta, 1889 yılında da Brill ve Libman adlı araştırmacılar yetişkin kanından *P. aeruginosa*'yı enfeksiyon etkeni olarak izole etmişlerdir. 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1917'de Frenkel ve 1925'de Osler patojen bir bakteri olarak tanımlamışlardır.İlerleyen yıllarda Bakteri hastane enfeksiyonlarında giderek önem kazanmaya ve risk oluşturmaya başlamıştır (Bilgehan, 1995; Aydın, 2001).

P. aeruginosa'yı, hastane enfeksiyonlarının önde gelen etkenlerinden biri olup, gram negatif, hareketli, aerop basillerdir. Konak savunması olan hastalarda enfeksiyon oluşturur ve önemli bir nozokomial patojendir *P. aeruginosa*, doğada yaygın olarak bulunur ve hastanelerde nemli ortamlarda bulunmaktadır. Birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra, tedavi sırasında da direnç geliştirmesi nedeni ile

P.aeruginosa ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde sorunlarla karşılaşmaktadır (Pier, 2005). Pseudomonaslar toprak ve suda yaygındırlar. Diğer *Pseudomonaslar* nadiren hastalık oluşturmaktadırlar. Normal insanları kolonize edebilirler ve bunlarda saprofitlerdir. Anormal konak savunması olan insanlarda hastalık oluşturmaktadırlar. *P. aeruginosa* 0,6x2 mikrometre boyutundadır. Gram negatiftir ve tek başına, ikili veya bazen kısa zincirler halinde bulunabilirler. *P. aeruginosa* bir çok kültür besiyerinde kolayca ürer, bazen tatlı ya da üzüm benzeri veya mısır benzeri koku oluşturur (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. *Pseudomonas aeruginosa*'nın besiyerlerindeki görüntüsü (a: EMB besiyeri b: Kanlı besiyeri).

P. aeruginosa 37-42 °C'da iyi üremektedir; 42°C'de üremesi onu floresan grubundaki diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırt etmede yardımcıdır. Oksidaz pozitifdir. *P. aeruginosa* yara ve yanıklarda enfeksiyon oluşturarak mavi yeşil renkte cerahat oluşmasına, lomber ponksiyon yoluyla menenjitte, kateter veya cihazlar ya da yıkama çözeltileriyle vücuda girdiğinde üriner sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. Özellikle kontamine solunum cihazlarından solunum yoluna geçmesi, nekrotizan pnömoniye yol açar. Bakteri, yüzücülerdeki hafif dış kulak iltihabında sık bulunur. Diyabetik hastalarda malign dış kulak iltihabına yol açar. Gözde hızla harabiyete yol açabilirler. Kan dolaşımına geçerek öldürücü sepsise yol açabilirler. Klinik olarak tek ilaçla tedavi edilmemelidir. Çünkü tek ilaç kullanıldığında bakterinin kolayca direnç geliştirmesine bağlı olarak

tedavide başarı oranı düşüktür. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında, kliniklerde tedavi seçenekleri arasında, kinolonlar, aminoglikozidler, karbapenemler ve sefalosporinler en çok kullanılan antibiyotikler arasındadır (Pullukçu ve ark. 2006). *P. aeruginosa* 'ya karşı etkili bir penisilin-tikarsilin veya piperasilin bir aminoglikolizid ile, genellikle torbapisilinle, kombine edilmelidir. *P. aeruginosa* 'ya karşı etkili diğer antibiyotikler aztreonam, imipenem, ve siprofloksasin de dahil, yeni kinolonlardır. Yeni sefalosporinlerden seftazidim ve sefoperazon *P. aeruginosa* 'ya karşı etkilidirler.

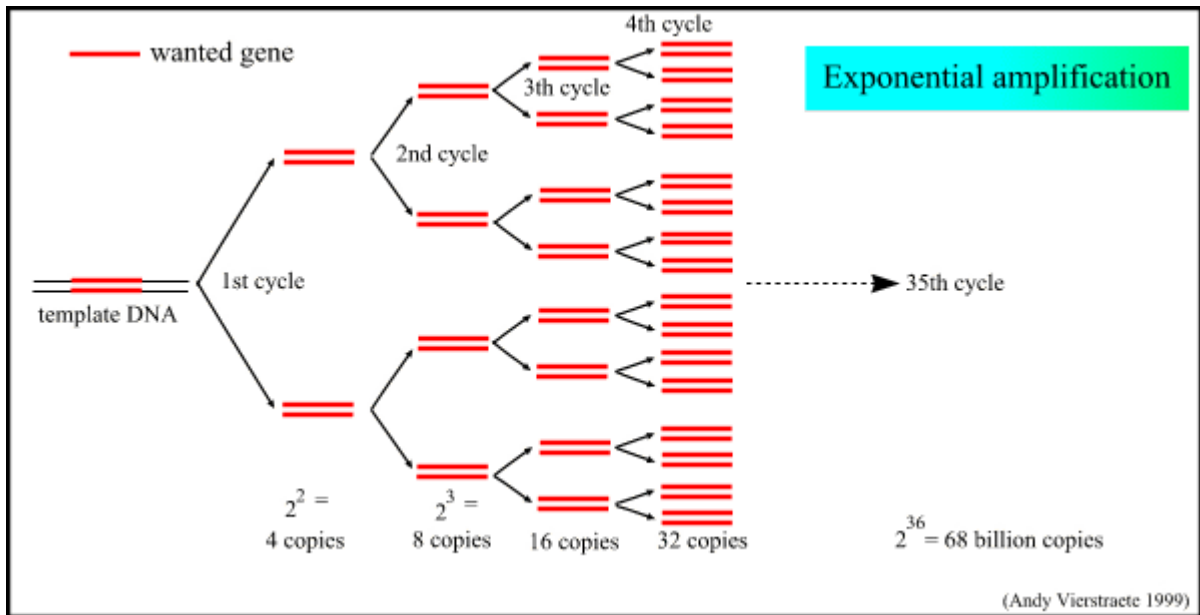
P. aeruginosa öncelikle bir nozokomiyal bir patojendir ve enfeksiyon kontrol yöntemleri diğer nozokomiyal patojenler için olanlara benzerlik göstermektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle savunma mekanizmalarının zayıfladığı immun yetmezlik durumlarında, malign ve metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bir patojendir. *pseudomonas* enfeksiyonlarında antimikrobiyal ajanlara direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda bulunması önemli bir sorundur. Çoklu direnç gösteren izolatların sayısı uygun olmayan antibakteriyel ajanların kullanımı nedeniyle giderek artmaktadır ve oluşan enfeksiyonların tedavisi ciddi problemler oluşturmaktadır.

Klinikte en sık karşılaşılan direnç beta-laktamaz enzimleri aracılığıyla olmaktadır. Bu direnç *pseudomonas* enfeksiyonlarında sık kullanılan ajanlardan olan beta-laktam antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle yaygın kullanıma bağlı olarak bu enzimlerle oluşan direncin tedavi öncesi rutin laboratuvarlarda belirlenmesi önem taşımaktadır (Nordmann, 1998). β -laktamazlar hidrolitik spektrumları, inhibitörlere duyarlılıkları, kromozom veya plazmid kontrolünde olmaları özelliğine göre farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır (Gur, 1997). Bush tarafından önerilen sınıflandırmaya göre; Grup I'de kromozomal beta-laktamaz grubundan "indüklenebilir beta-laktamaz"; Grup II'de plazmid kontrolündeki "geniş spektrumlu β -laktamaz" ve Grup III'de 'metallo- β -laktamazlar' yer almaktadır (Yorgancıgil, 1999).

Bunlar arasında metallo-beta-laktamazlar son zamanlarda yayılmaya başlayarak, *pseudomonas* ve diğer Gram negatif nozokomiyal patojenlerde geniş spektrumlu beta-laktam direncine neden olmaktadır (Migliavacca ve ark., 2002). Bu enzimlerin rutin laboratuvarlarda antibiyogram sonuçlarına göre değerlendirilerek klinisyene bildirilmesi ve ileri testlerin yapılacağı antibiyotiklerin belirlenmesi gerekmektedir (Gur, 1997).

2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Moleküler yöntemler, kültür tabanlı yöntemlerden duyarlılık ve mikroskopi, ve özgüllük açısından daha avantajlı olmaları sebebiyle son yıllarda yaygın popüler bir kullanım alanı bulmuşlardır. İlk kez 1985’ de PCR, ABD’de Cetus Corporation’da çalışan Erlich, Kary Mullis Henry A.S, ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilerek bilim dünyasına sunulmuştur. Buradaki amaç izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin DNA veya RNA primerler yardımı ile enzimatik olarak in vitro koşullarda sayıca çoğaltılması işlemidir. Çok az sayıda bulunan DNA’yı, ölçülebilecek miktarda çoğaltabilen bir sistemdir. Hücrelerde DNA doğal olarak, replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalında birbirinden ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Bu şekilde hücre bölünmesiyle yeni oluşan hücrelere tüm genler aynen geçerler. PCR’ da hedef DNA’yı, her ısı döngüsünde iki katına çıkarabilecek ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz kullanılmaktadır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. DNA'nın Replikasyonu

DNA replikasyonu için bir çok protein görev yapar. DNA'nın yüksek ısıya dayanıklı bir molekül olması nedeniyle replikasyonda görev alan bir çok proteinin yerine ısı gibi fiziksel etmenler kullanılır. Örneğin replikasyonun başlayabilmesi için gerekli olan

iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması ortamın 94° C' ye dek ısıtılması ve böylece iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılmasıyla sağlanır. Oysa, bir hücre denatürasyon adını verdiğimiz zincir ayrılmasını, 37° C de başarmak zorundadır. Bu yüzden “tek zincir bağlayan protein“ gibi yardımcı proteinlere gereksinim duyar. Replikasyonun başlamasında bir başka önemli olay “primaz” denen enzim tarafından genellikle 12 nükleotid uzunluğunda, replikasyonun başlayacağı bölgede bir RNA primerinin yapılmasıdır. DNA polimeraz bu primere bağlanıp, 3' ucuna nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yapar.

PCR' da ise replikasyonun başlatılacağı bölgeye özgün olarak bağlanan primerler tepkime karışımının içerisine önceden konur. Bu metot hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonunun laboratuvar ortamında in vitro koşullarında (tüp içerisinde) taklit edilmesi esasına dayanır. Bu şekilde laboratuvar ortamında nükleik asitlerin analiz edilmelerini sağlamaktadır (Mc Kane ve Kandel, 1996; Prescott ve ark., 1999). DNA, replikasyon ile çoğalır. Her yeni hücre jenerasyonunda genlerin kopya sayılarının iki katına çıkması nedeniyle jenerasyonlar boyunca DNA miktarı başlangıca göre üssel olarak artar. *In vitro* koşullarda istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlamasına ek olarak, 1980'li yıllardan itibaren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) da kullanılmaya başlanmış ve hızlıca yayılmıştır. Bu yöntemle teknolojinin bu kadar yayılmasının başlıca sebebi insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezini birkaç saat içinde gerçekleştirebilmesidir (Dikmen ve Özgünen, 2004).

2.1. PCR' da DNA Replikasyonu:

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. PCR' da DNA replikasyonu 3 aşamada gerçekleşir. Bunlar;

2.1.1. Denatürasyon

İlk basamak denatürasyondur. Çoğaltılacak DNA'nın çift zincirlerinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılarak tek zincir haline gelmesi durumudur. 94° C ye dek ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılması esasına dayanmaktadır. DNA replikasyonunun başlayabilmesi için çift iplikli DNA zinciri arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak zincirlerin birbirinden ayrılması gerekir. Hidrojen bağlarının birbirinden ayrılması için de

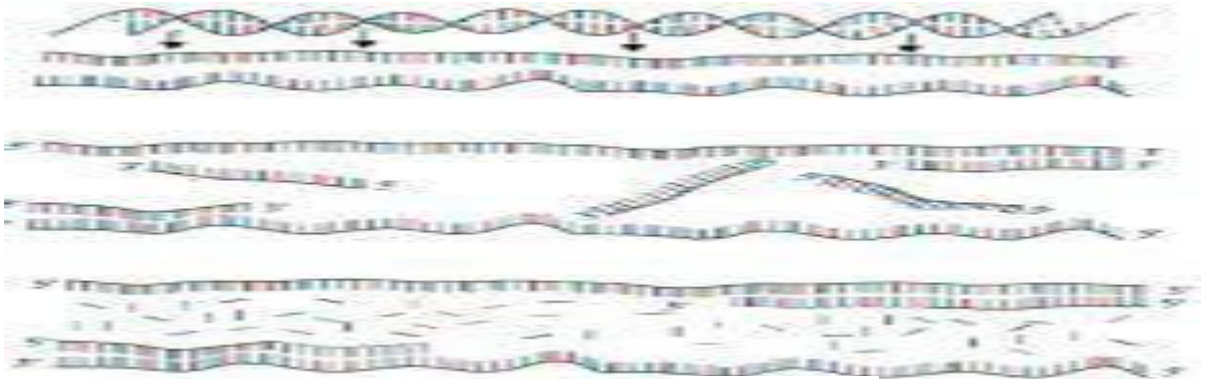
yüksek sıcaklık gerekir. DNA molekülünün yüksek sıcaklıkla sağlanarak (94°C-98°C) çift ipliklerin birbirinden ayrılması olayına denatürasyon denir. 37°C’de yaşamına sürdüren hücrede denatürasyon bir kısmı enzim yapısında olan yardımcı proteinlerle gerçekleşir. PCR’ da ise zincir ayrılması DNA moleküllerinin yüksek sıcaklığa dayanıklı olması nedeniyle ortamın 94°C-98°C’ye kadar ısıtılmasıyla gerçekleşmektedir (Dutton, 1998).

2.1.2. Annealing: (Hibridizasyon: Primer Bağlanması- Birleşme safhası)

Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağlarıyla bağlanmasıdır. Yüksek sıcaklıkta kalıp DNA molekülü denatüre edildikten sonra tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere sentetik oligonükleotidlerin bağlanmasıdır. PCR da, replikasyonu yapılacak bölgenin iki ucuna özgü olan baz dizilerini bu bölgedeki tanımlayıcı sentetik oligonükleotid primerler tepkime karışımının içerisine önceden konulur. Burada reaksiyon 37°C–65°C’de gerçekleşmektedir (Dutton, 1998).

2.1.3. Polimerizasyon: Extension (Çift İplikli DNA Sentezi- Uzama safhası)

Karışım DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, bunların 3’ ucuna kalıp DNA ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. DNA’ya spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler eklenerek zincirin uzaması sağlanır (Şekil 2.2.). Bu işlem 72°C’de gerçekleşir (Dutton, 1998).



Şekil 2.2. Primerlerin Kalıp DNA’ya bağlanması (Anonim, 2012).

Çoğaltılan DNA parçaları bir çok değişik yöntemlerle belirlenebilir. En yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR yöntemiyle elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır. Bundan sonra DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında görüntülenir. Elektroforez sırasında bir DNA molekül ağırlık standardı kullanılması ve PCR ürünlerinin büyüklüğü, önceden bilinen DNA molekülleri ile karşılaştırılması sonucu bulunur (Kocagöz, 1996). PCR ürünleri molekül ağırlıklarına ile agaroz jel elektroforezine göre ayrılır. Böylece DNA'nın varlığı gösterilebilir. Oluşan bantların özgünlüğü UV altında değerlendirilir. Bununla birlikte PCR'in özgünlüğü ve duyarlılığını etkileyen faktörler bulunmaktadır.

2.1.4. Polimeraz Zincir Tepkimesinin Bileşenleri

Polimeraz zincir tepkimesinin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı; örnek, amplifiye olacak primerlerin dizisi ve bölgenin uzunluğu tarafından belirlenir. Tepkime koşulları değişken olup en yüksek duyarlılık için dikkatlice yönetilmeye ve en verimli hale getirilmeye gereksinim duyar. Bu nedenle en uygun koşullar aşağıdaki PCR bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır (Eroğlu, 2008).

- ❖ Enzim (Taq DNA polimeraz)
- ❖ Deoksinükleotit Trifosfatlar (dNTP)
- ❖ Magnezyum Derişimi
- ❖ Tampon
- ❖ Oligonükleotit (primer)
- ❖ Hedef Diziler
- ❖ Isılar ve Döngü Sayısı
- ❖ PCR Engelleyicileri (İnhibitörleri) ve Artırıcıları

2.1.4.1. Enzim

Taq DNA polimeraz enzimi; *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimidir. Bu enzimin değişik rekombinant tipleri üretilmiştir. DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit

deoksiribonükleozid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Termostabil (sıcaklığa dayanıklı) DNA polimeraz enziminin PCR' da kullanılmaya başlanması araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Ayrıca, bu enzim 5'-3' polimerizasyona bağımlı ekzonükleaz etkisi taşıırken 3'- 5' ekzonükleaz etkisi yoktur. PCR tepkimesinde diğer değişkenlerin elverişli olduğu koşullarda bu enzimin önerilen derişim aralığı, 100 µl'lik tepkimede 1–5 ünite arasındadır. Eğer, Taq polimeraz enzim derişimi yüksek ise jel görüntüsünde özgül olmayan arka plan ürünler oluşabildiği gibi düşük olduğu durumlarda istenilen PCR tepkime ürünleri elde edilemez (Innis ve ark., 1990; White, 1993).

2.1.4.2. Deoksinükleotit Trifosfatları

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. PCR tepkimesinde hedef dizinin bileşimi ve uzunluğu için uygun en düşük dNTP derişiminde karar kılınmalıdır. Bununla birlikte, optimal dNTP konsantrasyonu MgCl₂ ve primer konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, çoğaltılmış ürün boyuna ve de PCR döngü sayısına bağılıdır. Her bir dNTP'nin 20–200 µM arasındaki derişimi verim, özgüllük ve doğruluk arasındaki en iyi denge ile sonuçlanmaktadır. PCR'nin hem özgüllüğü hemde doğruluğu düşük dNTP derişimleri kullanılarak artırılır. Düşük dNTP derişimleri hedef olmayan yörelerde hatalı kullanımı en aza indirger ve hatalı birleşmiş nükleotidlerin uzama olasılığı azaltır (Eroğlu, 2008).

2.1.4.3. Magnezyum Derişimi

Magnezyum derişimi, PCR tepkimesinde primer yapışmasını, hem kalıp hem de PCR ürününün zincir ayrışma ısılarını, primer-dimer kalıntılarının oluşumu, ürün özgüllüğünü ile enzim etkinliğini ve doğruluğunu etkileyebilmektedir. Taq DNA polimeraz kalıp DNA, primerler ve dNTP'ler ile bağlanmışın üzerinde serbest magnezyum gerektirmektedir. Bundan dolayı PCR' ler toplam dNTP derişiminin üzerinde 0.5–0.25 mM magnezyum içermelidir (Innis ve ark., 1990; White, 1993). Ayrıca, düşük Mg⁺² konsantrasyonu, enzim etkinliğini düşürerek ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg⁺² konsantrasyonu ise yanlış birleşmeleri destekleyerek spesifik olmayan ürün birikimine yol açar.

2.1.4.4. Tampon İçeriği

PCR için önerilen tampon 10–50 mM derişimdeki 20 0C’de PH 8,3- 8,8 arasındaki Tris HCl’dir. Ayrıca, tamponun içerisine potasyum klorür (KCl) veya sodyum klorür (NaCl) primer yapışmasını kolaylaştırdığı için eklenebilmektedir. NaCl ve KCl 50 mM üzerindeki derişimlerde Taq polimeraz enziminin etkisini engellemektedir. Jelatin ve Bovin serum albumin (BSA, 100 µg/ml) ve Tween 20 veya Laureth 12 (%0.05–0.1) gibi iyonik olmayan deterjanlar enzimi karalı kılmada yardımcı olurlar (White, 1993., Eroğlu, 2008).

2.1.4.5. Oligonükleotidler (Primer)

Gen çoğaltılması dahil PCR’ın birçok uygulaması için kalıp DNA’ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Bir PCR’de başarılı bir amplifikasyon için oligonükleotidler (primerler) doğru tasarlanmalıdır. Bu seçilmiş primer dizilimi PCR ürününün büyüklüğü ve yerini belirlemesi yanında ürün veriminde önemli olduğu gösterilmiş bir fiziksel değişken olan amplifiye ürünün primer yapışma sıcaklığını (Tm) tanımlar. En elverişli olan primerin derişimi 0.1–0.5 µM arasında olanıdır. Yüksek primer derişimleri hatalı dizilimlemeye neden olabilmektedir (White, 1993., Eroğlu, 2008).

Genelde primerler %50–60 Guanin+Sitosin (G+C) bileşimine sahip 18–28 baz uzunluğundaki nükleotidlerdir. Ayrıca, bir primer çiftinin hesaplanmış primer yapışma sıcaklığı (Tm) dengelenmiş olmalıdır. Bu amaçla pratik olarak Adenin (A) veya Timin (T) için 2 °C, Guanin (G) veya Sitosin (C) için 4 °C’lik hesaplama kullanılabilir. Çalışmaya bağlı olarak 55 °C ile 80 °C arasında Tm istenilir. Ayrıca primerlerin 3’ uçlarında C ve G’lerin serbestçe kullanımı (3 ya da daha fazla) G+C’den zengin dizilerde hatalı dizilimlemeler oluşturulabilir.

2.1.4.6. Hedef Diziler

Hedef diziler doğrusal DNA’lardan çok kapalı dairesel DNA’ları da taşıdığından belirgin şekilde daha az etkin olarak amplifiye edilir. Bu yüzden, polimeraz zincir tepkimesinde kalıp olarak kullanılmadan önce plazmid DNA ları doğrusal hale getirmek istenir. Ayrıca, kalıp DNA’daki hedef dizilerin derişimi belirgin olarak koşullara göre değişir ve sıklıkla deneycinin kontrolü altında değildir (Eroğlu, 2008).

2.1.4.7. Isılar ve Döngü Sayısı

Genel denatürasyon koşulları 95⁰C de 30 saniye veya 97⁰C de 15 saniyedir. Zincir ayrışma ısısında (Tss) DNA'yı denatüre etmek yalnızca birkaç saniye almakla birlikte geri kalan tepkime tüpünün iç kenarının Tss'ye ulaşma zamanıdır. Primer yapışması için gerekli zaman uzunluğu ve ısısı amplifikasyon primerlerinin baz derişimine, uzunluğuna ve içeriğine bağlıdır. Ayrıca, uygulanabilir yapışma ısısı amplifikasyon primerlerinin gerçek Tm 'nin 50 ⁰C altındadır. Taq DNA polimeraz ısılardan sınır aralıkları üzerinde etkin olduğundan primer uzaması yapışma basamağını da kapsayan düşük ısılarda oluşacaktır (Eroğlu, F.,2008, Newton ve ark.,1989). Polimeraz zincir tepkimesinde diğer değişkenlerin en elverişli olduğu koşullarda döngü sayısı, hedef DNA'nın başlangıç derişimlerine bağlı olacaktır. Bir tek kopya geni amplifiye etmek amacıyla 40 döngüden daha fazla döngü yapıyor ise PCR ile ilgili bazı ciddi hatalar vardır (White, 1993).

2.1.4.8. PCR Engelleyicileri (İnhibitörleri) ve Artırıcıları

PCR çeşitli maddelerin kullanımıyla inaktive edilebilir. DNA kaynağı, herhangi bir kişinin ortama dağılmış olan deri yada saç hücreleri, laboratuardaki çeşitli yüzeyler yada ortam havası tarafından kontamine olabilir. Bunların dışında PCR'da kullanılan bileşenlerin hemen tamamı hatta DNA polimeraz bile, kontaminasyon kaynağı olabilir. Yani birçok faktör PCR reaksiyonunun inhibe olmasına yol açar. Burada sadece optimizasyon çalışmaları için genellikle kullanılan inhibe edicilerden söz edilecektir. Çok sayıda değişik biyolojik materyal (hayvan dokuları ve vücut sıvıları, bakteri örnekleri, adli ve arkeolojik materyaller) PCR'de DNA kaynağı olarak kullanılır.

PCR' da insan DNA'sı; plasenta saç kökünden, biyopsi materyallerinden, koriyonik villusdan, amniyon sıvısından ve serebrospinal sıvı gibi değişik biyolojik kaynaklardan izole edilir. Bu doğal kaynaklar çok çeşitli reaksiyonları olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle inhibisyonun olmadığına ilişkin olarak PCR kontrolleri yapılması gerekmektedir.

2.2. PCR'da Kontaminasyondan Korumak için Alınabilecek Önlemler

- Kaliteli pipetler ve koruyucu pipet uçları tercih edilmelidir.
- Araştırmacıların eldiven, önlük, koruyucu gözlük vb. kullanmaları.
- Kullanılacak malzeme ve materyallerin, çözeltilerin steril edilmeleri.
- PCR çalışmasının steril bir kabin yada özel bir laboratuarda yapılması.
- Kullanılacak malzemeler ve bileşenlerin genel laboratuvar donanımından ve özellikle PCR ürünlerinin analizinde kullanılacak olan bileşenlerden ayrılmaları gibi önlemler alınarak kontaminasyondan korunma sağlanabilir.

2.3. PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi

PCR ürünleri (amplikonlar) boyları primerlerle sınırlandırılmış DNA parçası ya da parçaları'dır. PCR ürünlerinin analizi :

1. Başlangıç materyali olarak kullanılan DNA ya da RNA'nın kabaca ya da kesin miktarının belirlenmesi için çoğaltılmış PCR ürününün miktarının ölçülmesi

2. Dizi analizi

3. Hedef DNA dizisinin varlığının ve taşıdığı varyasyonun belirlenmesi, PCR tamamlandıktan sonra ürün kalitesi kontrol edilmelidir.

- Bazı durumlarda ürün oluşmuştur fakat çoğaltılacak gen uzunluğunda değildir. Bu gibi durumlarda primerlerden birisi diğer primere yakın bir bölgeye yerleşmiştir veya primerler yanlışlıkla tamamen farklı bir geni tanımış da olabilir bundan ötürü jelde birden fazla bant gözlemlenebilir.

- Primerlerin bazısı doğru yerlere yerleşmiştir, ancak bazıları yanlış yerleşerek, farklı dizilerin çoğaltılmasına neden olmuştur olabilir (İşcan, 2003).

- Fragmente edilmiş DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında, tanımlanmasında ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemler agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid (PAGE) elektroforezleridir. Bu metotların ilkesi; yapısındaki fosfat grubu nedeniyle negatif yüklere sahip olan DNA moleküllerinin elektriksel alanda pozitif elektroda doğru hareket etmesidir.

- Bu işlemde jel porları nedeniyle küçük DNA molekülleri daha hızlı hareket ederler. Yöntem basit olması, kısa zamanda yapılabilmesi ve yoğunluk gradienti gibi diğer

yöntemlerle ayrıştırılamayan fragmanların analizine olanak sağlaması bakımından moleküler biyolojide sıklıkla kullanılmaktadır. Standart agaroz jeller genellikle PCR ürünlerinin (200 bp-50 kb büyüklüğündeki DNA moleküllerinin) analizi için yeterli ayırma gücüne sahiptir. Poliakrilamid jeller ise daha çok 5-500 bp büyüklüğündeki DNA moleküllerinin analizlerinde kullanılmaktadır (Topçu, 2007).

Agaroz ya da poliakrilamid jellerde, bir flouresan boya olan ve DNA zincirlerinin arasına giren, etidyum bromür (EtBr) boyaması ile ürünler görülür. Boyamadan sonra DNA, jelde bir UV transilüminatörden yararlanılarak görülebilir hale gelir. Jelin kalıcı görünümü fotoğraflanarak elde edilir. Boyutu bilinen işaret DNA'lar ve kontrol PCR ürünleri de aynı elektroforez jeline uygulanır, böylece çoğaltılmış ürünün boyutu hakkında fikir edinilir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.4. PCR Optimizasyonu ve PCR ile Doğru Ürünün Çoğaltılması

PCR'nin etkinliği ve özgünlüğünde etkili olan çeşitli faktörler vardır. Bunlardan kalıp DNA'nın kalitesi, primer tasarımı, MgCl₂ konsantrasyonu, DNA polimeraz ve tampon koşulları özellikle önemli olanlardır (Grunewald, 2003).

2.4.1. Magnezyum İyonları

Magnezyum iyon konsantrasyonu PCR spesifitesi açısından önemlidir. dNTPMg⁺² kompleksleri nükleik asitlerin şeker-fosfat omurgası ile etkileşir ve *Taq* DNA polimeraz aktivitesini etkiler. Bu yüzden MgCl₂ konsantrasyonunun değişimi aynı şartlar altında bir diğerinden önemli ölçüde farklı davranan bir primer/template çiftine yol açabilir. Mg⁺² iyon konsantrasyonunun etkisini analiz etmek için genel strateji, standart tamponu ayarlamaktır ki MgCl₂ konsantrasyonu genellikle 0.5 ya da 1mM'lık aşamalarla 0.5 ve 5mM arasında değişir. Genelde konsantrasyonlardan biri, önemli ölçüde artmış PCR ürün örneği gösterecektir. Reaksiyonda dNTP'lerin konsantrasyonu değiştirildiğinde Mg⁺² konsantrasyonunun değiştirilmesi gerektiği hatırlanmalıdır (McPherson ve Moller, 2007).

Enzimatik DNA sentezi için optimal Mg⁺² konsantrasyonu kullanılan DNA polimerazın özellikleri tarafından belirlenir. Örneğin *Taq* ve *Klentaq* DNA polimerazlar için optimal Mg⁺² konsantrasyonu sırasıyla 1,5-2 ve 3-4 mM'dır. Bu nedenle kullanılan DNA polimeraza bağlı olarak PCR karışımında doğru Mg⁺² konsantrasyonunun kullanıldığından emin olmak gerekir. Çok yüksek Mg⁺² konsantrasyonu, DNA polimerazın

aktivitesini artırarak DNA sentezinin verimini artırırken non-spesifik ürünlerin amplifikasyonuna yol açabilir. Çok düşük Mg^{+2} konsantrasyonu ise PCR spesifitesini artırırken amplifikasyon veriminin düşmesine neden olacaktır (Ignatov ve ark., 2002).

2.4.2. Taq DNA polimeraz konsantrasyonu

Eğer hiç ürün bandı elde edilemediyse ya da zayıf bandlar elde edildiyse çok az Taq DNA polimeraz kullanılmış olabilir. Taq DNA polimerazın farklı versiyonları çeşitli spesifik aktivite ve konsantrasyonlarda sağlanabilir. Termostabil proofreading DNA polimerazlar Taq DNA polimerazdan daha düşük processiviteye sahip olabilir ve bu nedenle başarılı amplifikasyon için daha fazla enzime ihtiyaç duyulabilir. Termostabil polimerazların yüksek sıcaklıklarda inaktive olacağını hatırlamak da önemlidir çünkü polimerazların inaktivasyonu ürün miktarının azalmasına yol açabilir. Mümkün olduğunca düşük denatürasyon sıcaklığı kullanarak $90^{\circ}C$ 'nin üzerinde enzimin geçireceği zamanı sınırlandırmaya çalışmak önemlidir. Örneğin birçok protokolda tavsiye edilen $94^{\circ}C$ ' den ziyade $90^{\circ}C$ ya da $92^{\circ}C$ lik bir sıcaklık da çalışmak ve/ya da denatürasyon aşaması için süreyi azaltmak önemlidir (McPherson ve Moller, 2007).

2.5. Multiplex PCR

Bir PCR ile birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması çoklu (multipleks) PCR olarak adlandırılır. Multipleks PCR işlemi kalıp DNA yada DNA'larda birden fazla bölgeye bağlanan çok sayıdaki primer çiftlerinin kullanımı ile gerçekleştirilir. Bu PCR gen delesyonlarının haritalanması, küçük delesyonların, çerçeve kayması ve nokta mutasyonlarının analizinde kullanılan bir yöntem olduğundan "Duchenne Muscular Dystrophy" (DMD) ve kistik fibrozis gibi genetik hastalıkların tanısında kullanılmaktadır (Temizkan ve Arda, 2004).

Klasik veya Real-time PCR 'nin modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanmakta olan Multiplex PCR Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir yalnız her reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır. Multiplex PCR da tek bir reaksiyonda daha çok hedef bölge amplifikasyonu ile daha az zaman, araç ve gereç tasarrufu sağlanabilmektir ki bu özelliğinden dolayı kullanışlı ve tercih edilen bir yöntemdir. Yalnız bu çalışmalardan doğru sonuçlar alabilmek için önemli ölçüde optimizasyon gerekmektedir. Farklı hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında

amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli bir şekilde seçilmesi, birbirileriyle dimerizasyona girmemeleri ve annealing ısılarının birbirlerine uygun olması gibi bazı önemli ölçütlerin uyumlu olması sağlanmalıdır ki elde edilen sonuçlar anlam ifade edebilsin. Birbirinden farklı primer çiftlerinin non spesifik amplifikasyonların önüne geçilebilmesi ve en iyi konsantrasyonların seçimi için birçok deneme gerektirir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.6. PCR katkı maddeleri

Çeşitli "enhancer" bileşiklerin PCR'ın spesifitesini ve etkinliğini artırdığı bilinmektedir. Bunlar reaksiyonun etkin annealing sıcaklığını artıran kimyasalları, DNA bağlayıcı proteinleri ve ticari olarak elde edilebilir reagentları içerir. Böyle katkı maddeleri, primer annealing spesifitesini artırmak, primerlerin bağlanma olasılığını artırmak, özellikle GC'ce zengin diziler gibi zor kalıplar söz konusu olduğunda PCR verimini artırmak, ürün uzunluğunu artırmak, ürün spesifitesini artırmak, enzim stabilitesine katkıda bulunmak için PCR'lara ilave edilebilir.

Ayrıca enhancerlar sıklıkla PCR'ın ticari optimizasyon ve enhancer kitlerinin bileşenleri olarak kullanılırlar. Baz eşleşmesinin destabilizasyonuna yol açan katkı maddeleri özellikle GC'ce zengin diziler gibi zor kalıplar söz konusu olduğunda PCR' artırabilir ve yanlış eşleşen primer-kalıp komplekslerinin göreceli olarak daha fazla destabilize olmasını sağlayarak spesifiteyi de artırabilir. Bu bileşikler optimal olmayan PCR şartlarını iyileştirmek için bazı durumlarda yararlı olabilmesine rağmen bazıları, kalıpların ve primer kombinasyonlarının geniş bir aralığına uygulanamaz. Her PCR'da başarıyı kesinleştirecek olan 'bir katkı maddesi yoktur ve annealing sıcaklığı gibi farklı şartlar altında farklı katkı maddelerini test etmek gerekli olabilir. Farklı annealing sıcaklıklarının otomatik testine izin veren bir gradient termal döngü cihazı kullanımı ile böyle bir test kolaylaştırılır (McPherson ve Moller, 2007).

3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Thong ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada ikisi *S. aureus*'a ait altı adet primer kullanarak multipleks PCR ile metisilin dirençli *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterilerini tanımlamışlardır. Çalışmalarında bakterileri saf kültürlerden almışlardır. Yöntemin çok hızlı ve duyarlı olduğunu belirtmişler bununla birlikte direk klinik örneklerden çalışabilmek için daha çok çalışma gerektiğini bildirmişlerdir.

Bugarel ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada yüksek verimli PCR kullanarak shiga toksin üreten *EPEC* ve virülan olmayan *E. coli O26* suşlarını izole etmeye çalışmışlardır. Yöntem *E. coli O26* suşlarında çok iyi sonuç vermesine rağmen *EPEC* suşlarında başarılı olamamıştır.

Sasaki ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada çeşitli hayvanlardan aldıkları koagülaz pozitif *Staphylococcus* (CoPS) türlerini multipleks PCR kullanarak ayırmaya çalışmışlardır. Çalışmalarının sunucunda yedi farklı CoPS türünü birbirinden ayırt etmeyi başarmışlardır.

Maheux ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada içme sularında kültürde zenginleştirme yapmadan çok az sayıda *E. coli* ve *shigella* bakterilerini az miktarda suda real-time Pcr kullanarak yüksek spesifite oranıyla belirlemişlerdir.

Dong Hyuck ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada konak hücre DNA 'sındaki *E. coli* kalıntılarında tedavi amaçlı üretilen rekombinant protein ürünleri real-time PCR ile belirlemiş ve bunları blot yöntemler ile kıyaslamışlardır. Sonuç olarak bu yöntemin diğer yöntemlere göre daha kolay, tekrarlanabilir ve kesin olduğunu belirtmişlerdir.

Jeong ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada laboratuvar hayvanlarında triplex Pcr kullanarak *P. aeruginosa*, *Helicobacter hepaticus* ve *Salmonella typhimurum* bakterilerini eşzamanlı olarak belirlemişlerdir. Yöntem kolay, hızlı ve spesifik sonuç vermiştir. Böylelikle laboratuvar hayvanlarında bakterileri kısa sürede belirlemek ve eradike etmek kolaylaşmıştır. Dolayısıyla laboratuvar hayvanlarında kalite kontrol amaçlı kullanılabilir. Dolayısıyla laboratuvar hayvanlarında kalite kontrol amaçlı kullanılabilir.

Amagliani ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada real-time PCR kullanarak havuz sularında *P. aeruginosa* izole etmişlerdir. Çalışmalarında *P. aeruginosa* dışında 22 çeşit bakteri daha araştırmışlardır. Bulguları referans kültür metotlarıyla korelasyon göstermiştir.

Eshoo ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada PCR ve Electrospray Ionization Mass Spectrometry (PCR/ESI-MS) kullanarak kan örneklerinde bakteriyel kene kaynaklı Ehrlichia türlerini saptamışlardır.

Coimbra ve ark. (2011) bir hastanın yara enfeksiyonundan konvensiyonel yöntemlerle elde ettikleri koagulaz negatif *stafilokok* bakterilerine PCR ile dizi analizi yaparak *Staphylococcus sciuri* olduğunu göstermişlerdir.

Fosheim ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada bir salgın veya gözetim çalışmaları gibi çok sayıda hastanın olduğu durumlarda multiplex real-Time Pcr kullanarak metisilin dirençli *S. aureus* ile toksik şok sendromu toksini ve Panton-Valentine lökositidin' i kodlayan genleri kısa sürede belirlemişlerdir.

Hirotaki ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Staphylococcus sciuri* hariç insanlarla ilişkili yirmi dört stafilokok türünü multiplex Pcr kullanarak 100% doğrulukla tanımlamayı başarmışlardır. Buda klinik araştırmalarda bize çok yardımcı olacaktır.

Nandi ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada GABS' ları tanımlamak için birçok moleküler yöntem kullanmışlardır. Yaygın olarak kullanılan emm tiplendirme kadar random amplification of polymorphic DNA (RAPD) yönteminde etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Kimyasallar

Tez çalışmasının PCR bölümü Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, ÜSKİM Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmanın temel kimyasalları, Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Fermentas (USA), Promega (UK) ve Favorgen'den (Tayvan) temin edilmiştir

4.2. Bakteriler

Bu tez çalışmasında kullanılan (*S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*) bakteri suşları, Kahramanmaraş Araştırma ve Uygulama Hastanesinde çeşitli kliniklerde ve yoğun bakım ünitelerinden Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen kan, idrar ve yara gibi örneklerden izole edilerek stoklanan kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

4.3. Metot

Gelen örnekler rutin besiyerlerine ekilmiştir. Ertesi gün üreme olanlardan gram boyama yapıldı. Gram (+), kok morfolojisinde görülen izolatlara katalaz ve koagülaz testleri yapıldı. Katalaz testi pozitif olan bakteriler stafilokok olarak kabul edildi ve koagülaz testi uygulandı. Koagülaz pozitif ise söz konusu bakteriler *S. aureus* olarak tanımlandı. Katalaz negatif olan bakteriler streptokok olarak tanımlandı ve grup tayinine geçildi. Grup tayini için lateks aglütinasyon testi yapıldı ve gruplar belirlendi. Gram negatif bakterileri otomatize vitek II cihazına yüklenerek 8-16 saat içerisinde alınan sonuçlar değerlendirilerek *P.aeruginosa* ve *E.coli* identifiye edildi.

Gram boyama : Üreyen kolonilerden temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik ile preparat hazırlandı. Kuruduktan sonra alevden geçirilerek bakteriler tespit edildi. Preparat daha sonra Kristal viyole, lugol, alkol ve son olarak bazik fuksin ile boyanıp yıkanıp kurumaya bırakıldı. Daha sonra preparat ışık mikroskobunun x 100 'lük objektifinde immersiyon yağı ile incelendi.

Katalaz testi : Süpheli stafilokok kolonisinden temiz bir lam üzerine öze ile bir miktar bakteri konup, üzerine H₂O₂ damlatıldı. Hava kabarcıklarının oluşumu katalaz pozitif olarak değerlendirildi .

Tüpte plazma koagülaz testi : Kanlı agardan alınan bir stafilokok kolonisi 1/5 oranında dilüe edilmiş insan plazmasının 1 ml'si üzerine ilave edildi ve 37° C de inkübe edildi. 1, 3, 6. ve 24. saatlerde pıhtılaşma olup olmadığına bakılarak izolatlar değerlendirildi .

PCR : Belirlenmiş olan bakterilerin moleküler olarak tanımlanması; primerlerin tasarlanması ve multiplex PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) işlemini kapsamaktadır.

4.4. Primerler

İzole edilen *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin kolonileri, 16S rRNA'yı kodlayan DNA bölgesi üzerinden tasarlanmış primerler ile yapılan PCR ile de teyit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* için Cuny ve Witte (2005) yaptıkları çalışma, *Streptococcus pyogenes* için Liu ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışma, *Escherichia coli* için toma ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışma, *Pseudomonas aeruginosa* için Qin ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışma referans alınmıştır. Çizelge 3.1'te çalışmada kullanılan primerlerin dizilimleri (5'→3') ve bant uzunlukları verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin tanımlanması için tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri.

Mikroorganizma adı	Primerler	Dizilim (5'→3')	Hedef Gen	Beklenen bant uzunluğu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sa-F Sa-R	TATGATATGCTTCTCC AACGTTTAGGCCATACACCA	<i>mecA</i>	400 bp
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SpP-F Sp-R	AAAGACCGCCTTAACCACCT TGGCAAGGTAACTTCTAAAGCA	<i>spy1258</i>	407 bp
<i>Escherichia coli</i>	Ec-F Ec-R	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	<i>aggR</i>	254 bp
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa-F Pa-R	ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTG CTTGCGGCTGGCTTTTCCAG	<i>oprI</i>	249 bp

4.5. Multipleks PCR:

Multipleks PCR (mPCR) primer olarak *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerin 16 S RNA gen bölgesinden büyüklüğü 407,400, 254 ve 249 bp arasında değişen parçaları amplifiye eden *spy1258*, *mecA*, *aggR* ve *oprI* spesifik primerler kullanıldı. Reaksiyon karışımı final konsantrasyonu 40 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı; 30.5 µl dH₂O, 1'er µl ileri ve geri primerlerden, 4 µl 10X tampon, 0.5 M 1 µl dNTP, 0,5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) karıştırılarak hazırlanmıştır. DNA olarak 10 µl dH₂O'da çözdürülen koloniden 1 µl kullanılmıştır. PCR işlemi 95 °C'de 4 dk. ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dk. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı (60 °C)'nda 1 dk. ve 72 °C'de uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1'lik jel hazırlanarak, elektroforeze yüklenmiş PCR ile çoğaltılan bölgeler UV ışığında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

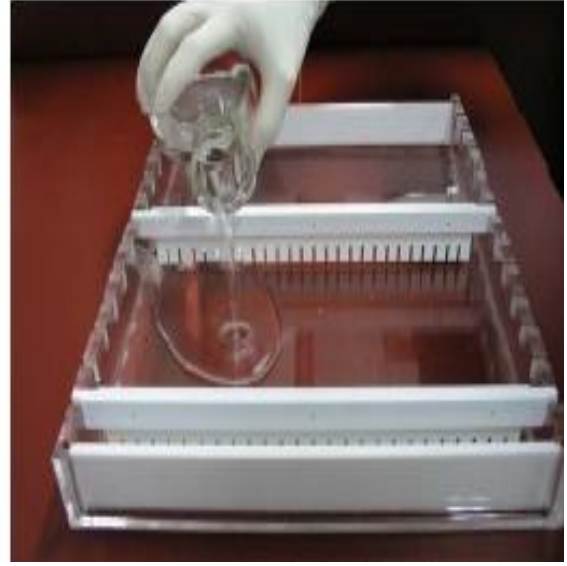
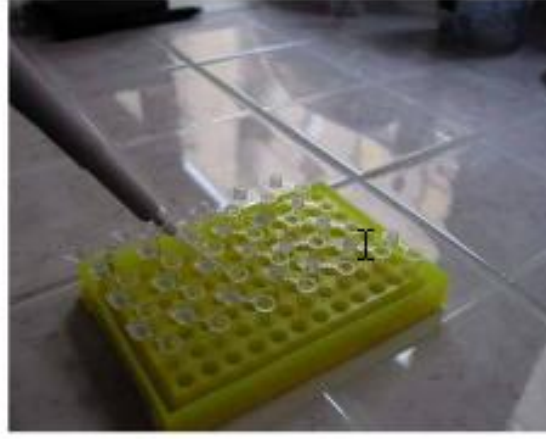
4.6. DNA'nın Jel Elektroforezi

Agaroz jel hazırlamak üzere; %1 oranında agaroz, 1X Tris, Borik asit, EDTA (TBE) tampon çözeltisine alındı [1000 ml TBE (1X) tampon çözeltisi hazırlamak için; 5,5 g Borik asit, 10,8 g Trizma base ve EDTA (500 mM) çözeltisinden 4 ml eklenerek 1000 ml saf su ile karıştırılır ve mikrodalga fırında hafif kaynatılıp agarozun tamamen çözünmesi sağlandı (Şekil 3.1.).



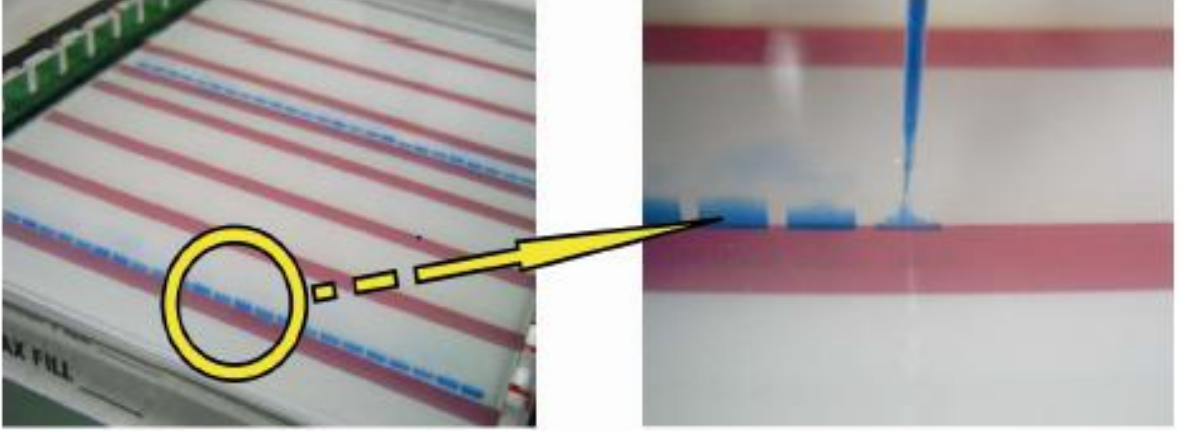
Şekil 4.1. Agarozun hassas terazide tartımı ve mikrodalga fırında eritilmesi

Erlenmayer düzenli olarak karıştırılarak çepere yapışan taneciklerin çözeltiye katılması sağlandı. Elektroforez düzeneği kurulduktan sonra, agaroz çözeltisi tarağın dişleri arasında ya da altında hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek kalıbın içerisine döküldü (Şekil 3.2.). Agarozun tampon içinde çözündükten sonra elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde jel tabakasına döküldü ve kuyucukların oluşması için jel sistemine tarak yerleştirilerek donması beklendi. Donma gerçekleştikten sonra tarak oluşan kuyucuklara zarar vermeyecek şekilde ortamdan dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. Tanka 1 X TBE tamponu jelin üzerini tamamen örtecek şekilde aktarıldı. Analiz edilecek DNA örnekleri 1/5 (loading buffer/DNA) oranında yükleme solüsyonu [10 ml DNA loading buffer için; 0,025 mg bromophenol blue, %40 sükröz ve 2,5 ml EDTA (100 mM) (pH 8,0)] eklenerek yüklemeye hazırlandı ve mikro pipetler yardımı ile dikkatlice jele yüklendi. λ DNA 100 baz çiftlik ya da 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanıldı (Şekil 3.3.).



Şekil 4.2. Reaksiyon karışımının hazırlanması

Marker DNA parçalarının uzunluğu bilindiğinden parçacıkların jelde göçü ölçüt alınarak örneklerdeki DNA parçacıklarının uzunluğu saptanabilmektedir. Örneğimizden elde edilen DNA bandı kendi hizasındaki markörün DNA bandı ile karşılaştırılarak bant hedef DNA ile aynı uzunlukta bulunduğu anda bunun o mikroorganizmaya ait olduğu düşünülür. Elektroforez tankında (ATTO Corporation), jel 100 V ve 500 mA (Biolab; PS 503) altında koşturuldu. Koşturulan agaroz jel Et-Br (0,5 µg/ml) ile 20 dakika boyandı ve DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.



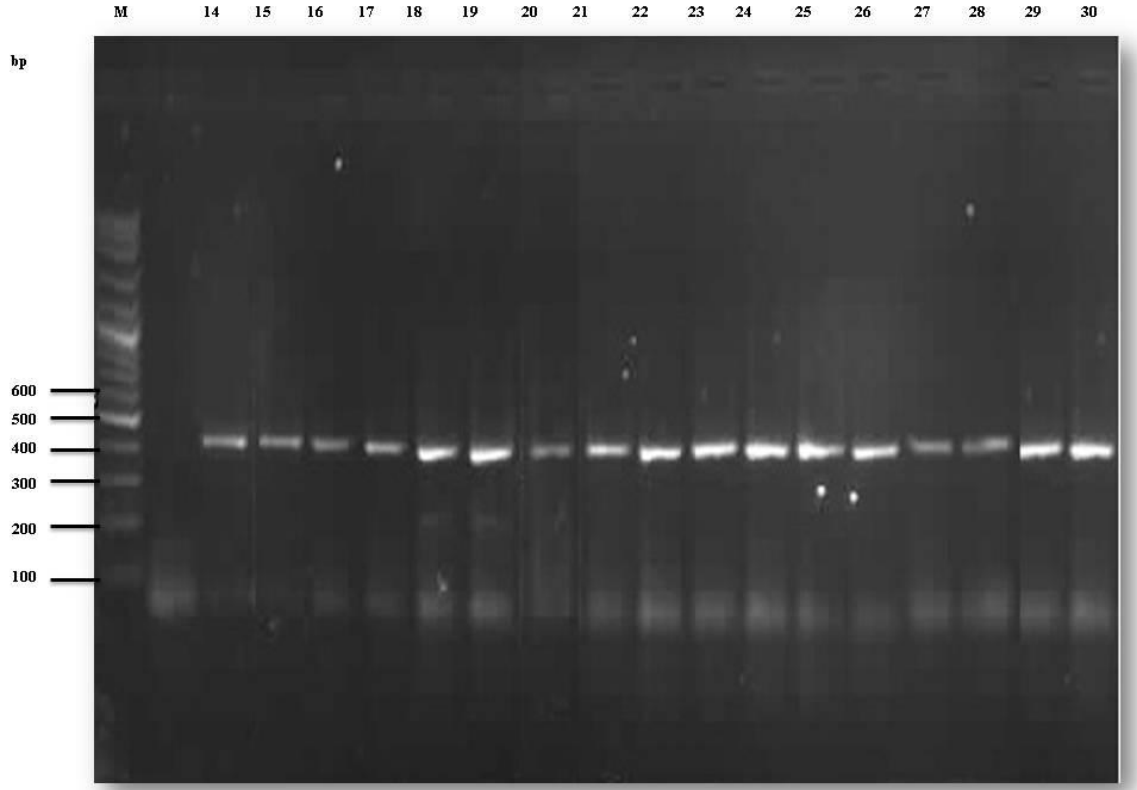
Şekil 4.3. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi



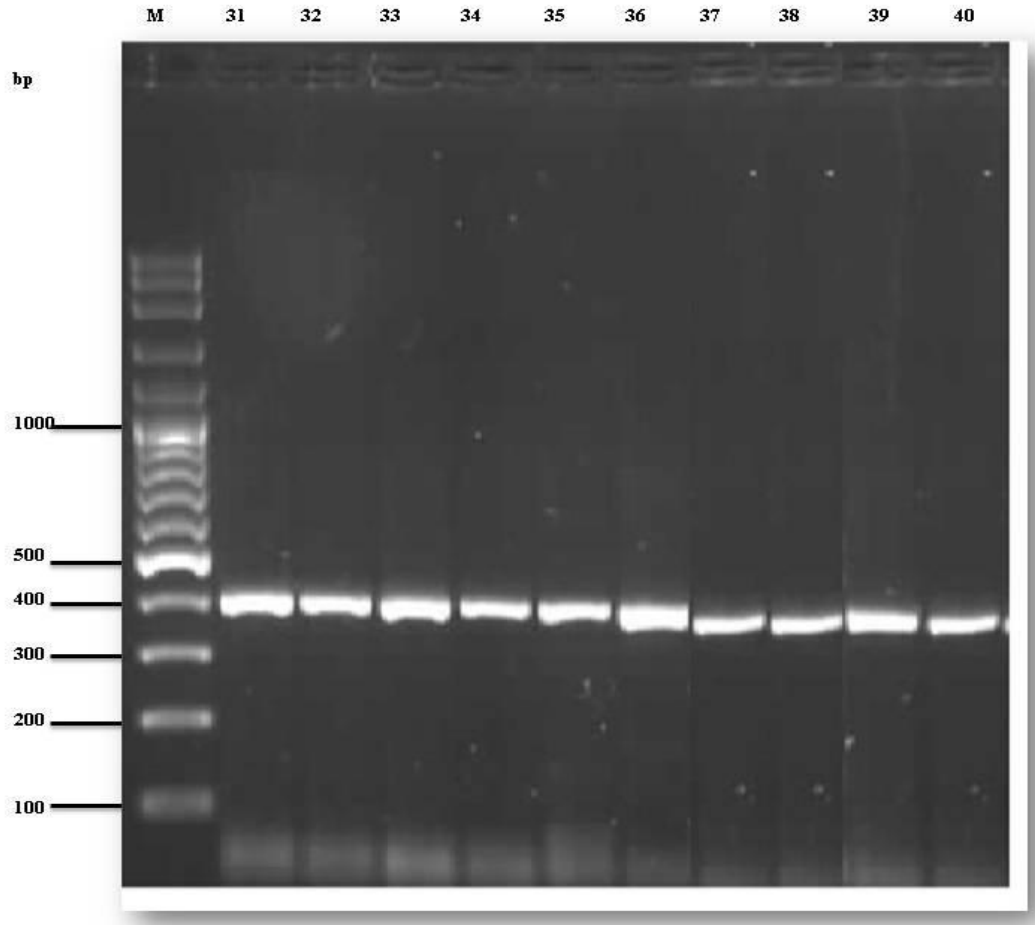
Şekil 4.4. Yatay agaroz jel elektroforezi düzeneği

5. BULGULAR

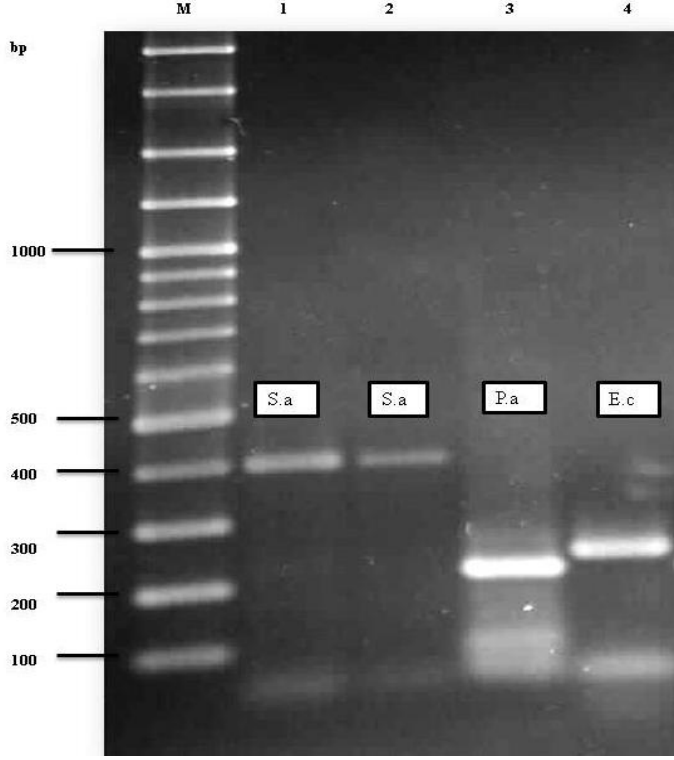
Çalışmada, mPCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde *S. pyogenes* için 407 bp, *S. aureus* için 400 bp (base pair), *E. Coli* için ise 254 bp, *P. aeruginosa* için 249 büyüklüğünde bandların oluşumu beklendi. PCR ürünlerinin agaroz jelde UV Transilüminatörden elde edilen görüntüleri aşağıda belirtildi (Şekil 4.1. - 4.5.).



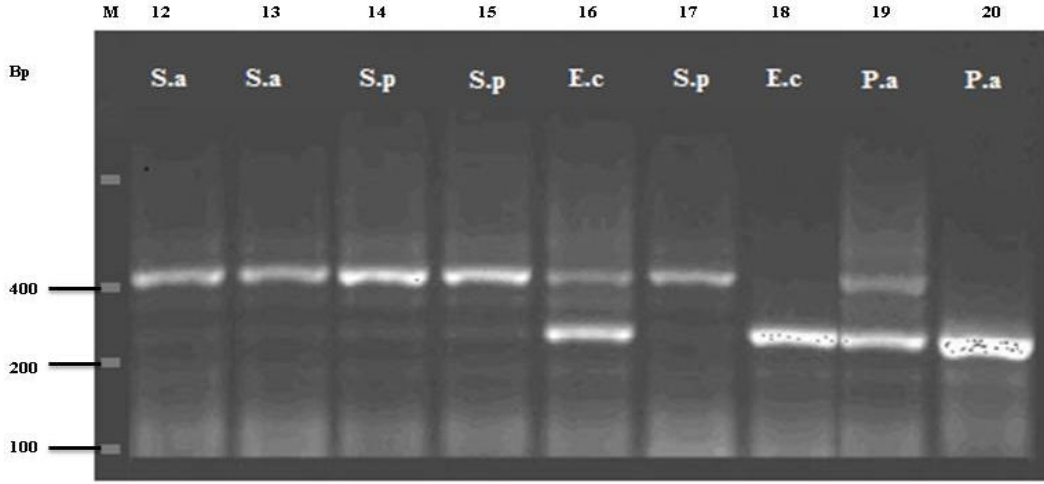
Şekil 5.1. *S. pyogenes* DNA'sı kullanılarak yapılan Multiplex PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi sonrası UV Transilüminatörden elde edilen görüntüsü (kuyucuk 14- 30). Kuyucuklar SpP-F ve Sp-R primerleri kullanılarak yapılan PCR ile hedeflenen 407 bp bant görüntüsünü vermektedir.



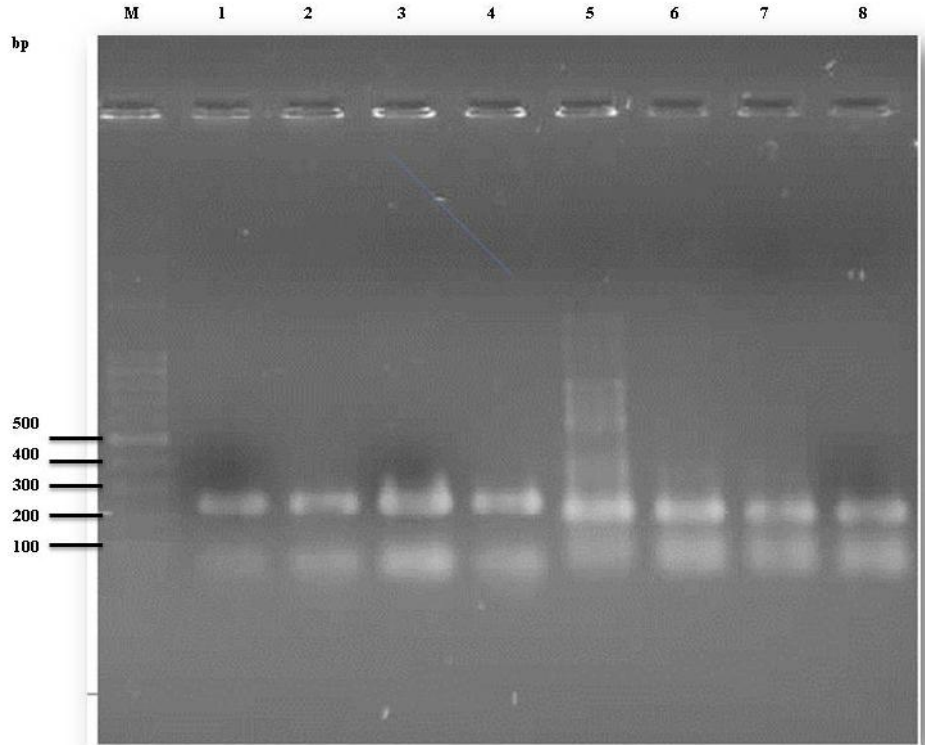
Şekil 5.2. *S. aureus* DNA'sı kullanılarak yapılan Multiplex PCR ürünlerinin %1'lık agaroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden elde edilen görüntüsü (kuyucuk 31-40). Kuyucuklar Sa-F ve Sa-R primerleri kullanılarak yapılan PCR ile hedeflenen 400 bp bant görüntüsünü vermektedir.



Şekil 5.3. *S. aureus* için 400 bp (1.ve 2.), *E. Coli* için ise 254 bp(4.), *P. aeruginosa* için 249 büyüklüğünde(3.) oluşan bandların görüntüsü



Şekil 5.4. 12. ve 13. kuyucuklar Sa-F ve Sa-R primerleri kullanılarak *S. aureus* için hedeflenen 400 bp bant görüntüsünü vermektedir. 14., 15. ve 17. kuyucuklar SpP-F ve Sp-R primerleri kullanılarak *S. pyogenes* için hedeflenen 407 bp bant görüntüsünü vermektedir . 16. ve 18. kuyucuklar Ec-F ve Ec-R primerleri kullanılarak *E. coli* için hedeflenen 254 bp bant görüntüsünü vermektedir . 19. ve 20. kuyucuklar Pa-F ve Pa-R primerleri kullanılarak *P. aeruginosa* için hedeflenen 249 bp bant görüntüsünü vermektedir.



Şekil 5.5. İlk 4 kuyucuk Ec-F ve Ec-R primerleri kullanılarak yapılan PCR ile *E. coli* için hedeflenen 254 bp bant görüntüsünü vermektedir. Son 4 kuyucuk Pa-F ve Pa-R primerleri kullanılarak yapılan PCR ile *P. aeruginosa* için hedeflenen 249 bp bant görüntüsünü vermektedir

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1990'ların sonları ve 2000'lerin başlarında biyoteknolojide yaşanan gelişmeler, özellikle enfeksiyöz hastalıkların tanısında kullanılan modern tekniklerin gelişmesi ve belirgin ölçüde hassaslaştırılması ile sonuç bulmuştur. Modern teknikler moleküler biyolojinin vazgeçilmezleri arasındadır ki dünya genelinde hastalıkların tanısının konulmasında, antimikrobiyal tedavinin belirlenebilmesinde ve hastane enfeksiyon kontrolü için klinik laboratuarlarda rutin olarak kullanabilmektedirler (Pfaller, 2001; Wolk, 2001; Raoult, 2004).

Enfeksiyon hastalıklarında tanının konulması, tedavide nasıl bir yol izlenebileceği açısından oldukça önemlidir. Örneğin kişilerde ya da toplumda var olan bir enfeksiyonun hızlı güvenilir bir şekilde tanımlandığında ve özellikle enfeksiyona neden olan organizmanın herhangi bir direncinin olup olmadığı da tespit edildiği takdirde tedavinin hangi ilaç ile başlanacağına karar verilmesi oldukça önemlidir. Hastanın ya da salgının tedavisine ve bu tedavi sürecinin nasıl işleneceğine ne kadar kısa sürede karar kılınırsa hastalığa sebep olan etmenler hızlı bir şekilde giderilip iyileşme sürecine çabucak ulaşılabilir. Moleküler düzeylerde yapılan analizlerin bakterilerin belirlenebilmesi için oldukça güvenilir sonuçlar ortaya koydukları araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Laguerre ve ark., 1994; Lavenir ve ark., 2007).

PCR yöntemi, enfeksiyonel hastalıklara veya salgınlara neden olan mikroorganizmaları ve varsa dirençlerinin belirlenebilmesini hızlı ve güvenilir bir şekilde yapabildiği için günümüzde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda kullanılan PCR yöntemi hastalık etkeninin bulunmasında daha pahalı ve kontaminasyona elverişli bir yöntem olmasına rağmen yaşamı tehdit eden vakalarda etkenin belirlenmesinde konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı, daha hassas ve doğru sonuç verdiği için konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerden daha fazla tercih edilmektedir. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler çalışılan her bir bakterinin (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*) genine özgün olduğu için PCR tekniği ile mikroorganizmaları kesin olarak tanımlayabilmekteyiz ki bu sayede hastalıkların ya da salgınlardan tanı ve tedavi sürecini olumlu yönde etkileyerek hastaların yaşam kalitelerine tekrardan kavuşabilmelerini kısa bir sürede sağlanabilecektir.

Maliyetlerin azaltılması ve de daha hızlı bir şekilde güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için çeşitli örneklerden *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli* ve *P.aeruginosa* gibi yaşamı tehdit eden mikroorganizmalar direk genomik DNA saflaştırması yapılmadan teşhis edilmek istenilen mikroorganizma genlerine özgün yapılan literatür çalışmalarında genel olarak mikroorganizmaların tanısında konvansiyonel yöntemlerden faydalanılmış yada DNA saflaştırma işlemine gidilerek tanı konulmaya çalışılmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada ise diğer çalışmalardan farklı olarak *S. aureus*, *S.pyogenes*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* mikroorganizmaları için DNA saflaştırma işlemine gidilmeksizin doğrudan koloni PCR ile mikroorganizmaları tanımlamaya çalışılmıştır. Bu gibi çalışmalarda tanı genomik DNA saflaştırarak yapıldığı takdirde tanı koymadaki süreç konvansiyonel bakteriyolojik tanı yöntemleri için gereken süre ve de maliyet açısından pek fazla anlam ifade etmeyecekti. Ayrıca çoklu primerler kullanılıp bu gen parçaları amplifiye edilerek tanımlanmaları sağlanmıştır.

Günümüzde hızlı ilerlemeler gösteren moleküler tekniklerin, klinik mikrobiyoloji çalışmalarında mikroorganizmaların DNA analizlerinin yapılabilmesi için konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. DNA analiz çalışmalarında da genel olarak son zamanlarda yaygın olarak kullanılan ve çok hassas moleküler bir yöntem olduğu kabul görülen PCR kullanılmaktadır (Vandamme ve ark., 1994; Van Pelt ve ark., 1999).

PCR tekniğinde kullanılan materyal çok az miktarda bile olsa çoğaltılabilmekte ve kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Oysa klasik yöntemlerde kullanılan materyalin miktarı önemlidir ve az miktardaki numune yapılan çalışmalarda istenilen sonuca sağlıklı bir şekilde ulaşmaya ciddi bir engel teşkil etmektedir. Bu nedenle PCR tekniği mikrobiyolojik çalışmaların vazgeçilmezi olmuştur ve kullanım alanı giderek artmaktadır (Mahenthalingam ve ark., 1996). Kan serumu, doku yada hücre gibi kullanılan materyallerin yanısıra eski zamanlara ait olan kurutulmuş örneklerden de (antropolojik çalışmalar) nükleik asitler ekstrakte edilebildiğinden ve hedef DNA'nın çok küçük konsantrasyonlarının dahi yeterli olabilmesi nedeniyle oldukça pratik bir yöntem kabul edilmektedir.

PCR tekniğinin avantajlarından biri de birden çok numunenin bir arada test edilebilmesidir ki, buda araştırmacıları bu tekniği kullanmaları yönünde teşvik etmiştir. Böylelikle bir defada birden fazla numunenin analizine fırsat vererek zaman ve maliyetten

kazanç sağlanır. Klasik yöntemlerde ise her bir numune için tek tek analiz yapılması gerekir. Buda zaman kaybına ve maddi külfete neden olmaktadır. Bilimsel çalışmalarda özellikle zaman ve maliyetin önemi ve bununla beraber güvenilir sonuçları elde edecek olmak pcr tekniğinin vazgeçilmez alternatifler arasında yer almasını sağlamıştır. Ayrıca PCR ile testlerin istenildiği anda tekrarlanabilir olması PCR çalışmalarının güvenilirliğini göstermektedir. Buna karşın konvansiyonel yöntemlerle yapılan çalışmalarda herhangi bir basamakta meydana gelen hatada analiz tekrar en başa dönülerek yapılması gerektiğinden zaman alıcı zahmetlidir. PCR'da ise örneğin Elektroforez basamağında meydana gelen bir hata elektroforezin tekrarıyla çözümlenebilir. Bu durumda çok fazla zaman kaybına sebebiyet vermemektedir (Vandamme ve ark., 1994; Van Pelt ve ark., 1999).

7. REFERANSLAR

- Amagliani, G., Parlani, M., L., Giorgio Brandi, G., Sebastianelli, G., Stocchi, V., Schiavano, G., F., 2011. Molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational water. *International Journal of Environmental Health Research*, 2:1, 60-70.
- Anonim. 2012.
- Arda, B., Ulusoy, S., 2003. Tonsillofaranjitler. Üst solunum yolları enfeksiyonlarının tedavisi. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi, s37-44.
- Aydın, F., 2001. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması. Uzmanlık Tezi. Ankara:Ankara Üniversitesi.
- Baron, EJ., Peterson, LR., Finegold SM., 1994. Enterobacteriaceae. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (Editörler: Baron. EJ., Peterson, LR., Finegold, SM.).Mosby, Baltimore. s362-387.
- Bilgehan, H., 1990. Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları, izmir. s184-204.
- Bilgehan, H., 1992. Enterobacteriaceae. “Klinik Mikrobiyolojik Tanı” Fakülteler Kitabevi, Ankara. s387-411.
- Bilgehan, H., 1995 . Non-fermentatif Gram olumsuz basiller. Klinik Mikrobiyoloji.İzmir: Barış Kitabevi, 161-178.
- Bugarel, M., Beutin, L., Scheutz, F., Loukiadis, E., and Fach, P., 2011. Identification of Genetic Markers for Differentiation of ShigaToxin-Producing, Enteropathogenic, and Avirulent Strains of *Escherichia coli* O26. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 2011, p. 2275-2281.
- Coimbra, D., G., Almeida, A., Júnior, J. B.O., Silva, L., Pimentel, B., J., Gitaí, D. L.G., Moreira, L., S., Silva-Filho, E., A., Andrade, T., G., 2011. Wound infection by multiresistant *Staphylococcus sciuri* identified by molecular methods. *New microbiologica*, 34, 425-427.

- Cuny. C., Witte, W., 2005. PCR for the identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne orfX. Clin Microbiol Infect, 11: 834–837.
- Çiçek, E., 2008. Ege bölgesindeki sığırların süt ve dışkı örneklerinden *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu ve verotoksinlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., 1990. Microbiology, 4th ed., Lippincott Co., Philadelphia. S.30-37, s169-172.
- Dikmen, N., Özgünen, T., 2004. “Harper Biyokimya” Dutton, G., 1998. Advances in Polymerase Chain Reaction. Genetic Engineering News, s16-18.
- Dong Hyuck, L., Bae, J., Lee J., Shin, J., and Kim S., 2010. Quantitative Detection of Residual E. coli Host Cell DNA by Real-Time PCR J. Microbiol. Biotechnol., 20(10), 1463–1470.
- Dutton, G., 1998. Advances in Polymerase Chain Reaction. Genetic Engineering News, s16-18.
- Dündar, V., Dündar, D.Ö., 2002. Stafilokok enfeksiyonları, enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (Editörler: Topçu, W. A., Söyletir G., Doğanay, M.) Nobel Tıp Kitabevleri, cilt 2, s1507-1516.
- Eshoo, M., W., Crowder, C., D., Li, H., Matthews, H., E., Meng, S., Sefers, S., E., Sampath, R., Stratton, C., W., Blyn, L., B., Ecker, D., J., and Tang, Y., 2010. Detection and Identification of *Ehrlichia* Species in Blood by Use of PCR and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Journal of clinical microbiology, feb., p. 472–478.
- Eroğlu, F., Kutanöz Leyişmanyozlu Hastalarda Etken türlerin PCR RFLP ile Belirlenmesi, 2008, Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana ss. 61.
- Fosheim, G. E., Nicholson, A. C., Albrecht, V. S., and Limbago B. M., 2011. Multiplex real-time pcr assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

and associated toxin genes. Journal of clinical microbiology, aug. 2011, p. 3071–3073.

Grunewald, H., 2003. Optimization of Polymerase Chain Reactions. Methods in Molecular Biology, Bartlett, J., Stirling, D., Humana Pres, Totowa NJ. s89-99.

Gur, D., 1997. β -laktamazlar, Flora sayı 2(Ek 3), s1-18.

Hirotaiki, S., Sasaki, T., Kuwahara-Arai, K., and Hiramatsu K., 2011. Rapid and accurate identification of Human-Associated Staphylococci by use of Multiplex PCR. Journal of clinical microbiology, oct., p. 3627–3631.

Ignatov, K. B., Miroshnikov, A.I., Kramarov, V. M., 2003. A New Approach to Enhanced PCR Specificity. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 29: 368-371.

Innis, M A., Gelfand, D H., Sninsky, J J., White, T J., 1990. PCR Protocols: A Guide to methods and Applications, Academic Press Inc., San Diego, California.

İşcan, M., 2003. Moleküler Genetikte Modern Teknikler: Biyoinformatik-I (editörler:Telefoncu, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Pazarlıoğlu, N.), s71-77.

Jacoby, GA., 1991. Archer, GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. New Engl J Med, 324:601-612.

Jeong, E., Lee, K., Heo, S., Seo, J., Choi, Y., 2011. Triplex pcr for the simultaneous detection *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter hepaticus* ve *Salmonella typhimurum*. Exp. Anim. 60(1), 65-70.

Karadenizli, A., Kolaylı, F., Vahaboğlu, H., 2003. İki yıl arayla izole edilmiş olan Streptococcus pyogenes suşlarında penisilin ve makrolit duyarlılığının araştırılması, enfeksiyon Derg., Sayı 17(1) s35-37.

Kingsbury, D.T., Wagner, G.E., 1992. Mikrobiyoloji, The National Medical Series for Independent Study, 2. baskı, (Editörler: Serter D., Ertem E., Dereli D., Tünger A.), Saray Tıp Kitabevleri, izmir, s81-94

- Mc Kane, L., Kandel, Y., 1996. Microbiology Essentials and Applications. Boston. s33-45.
- McPherson, M., Moller, S., 2007. PCR, , Taylor & Francis,288s.
- Migliavacca, R., Docquier, JD., Mugnaioli, C et al., 2002. Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 40(11):4388-90.
- Murray, BE., 1991. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. J.Infect Dis, 163:1185-1194.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A., 1998. Staphylococcus and Related Organisms: Medical Microbiology. Mosby. s175-188.
- Nandi, S., Ganguly, N. K., Kumar, R., Bakshi, D. K., Sagar V., and Chakraborti A., 2008. Genotyping of group A streptococcus by various molecular methods. Indian J Med Res 127, January, pp 71-77.
- Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C., Markham, A. F., 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids*, 17:2503-2516.
- Nordmann, P., Guibert, M., 1998. Extended spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, J Antimicrob Chemother, 42(2):128-132.
- Pfaller MA, Yu W., 2001. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. Infect Dis Clin N Am 15: s1227–1261.
- Pichichero, ME., Marcossi, SM., Murphy, ML., Hoeger, W., Gren, JL., 1999. Sorrento A.Incidence of streptococcal carriers in private pediatric practice. Arch Pediatr Adolesc Med. 153: 624–628.
- Pier, GB., Ramphal, R., 2005. *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.(Editörler: “Mandell, GL., Bennet, JE., Dolin, R.,”) 6.baskı, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia. s.2587-615.
- Pullukçu. H., Aydemir, Ş., Turhan, A., Tünger, A., Özinel, MA., Ulusoy, S.,2006. Normalde steril örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin

çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları: beş yıllık sonuçların değerlendirilmesi. enfeksiyon Derg, Sayı 20(2), s.111-6.

Relman ve Persing, 1996 Relman, D. A., Persing, D. H., 1996. Genotypic methods for microbial identification. PCR Protocols for Emerging Infectious Disease, 3-31s.

Ryan, KJ., 1994. Enterobacteriaceae. “Sherris medical Microbiology (an Introduction to Infectious Diseases)” (Editör: Ryan. KJ.) Prentice-Hall International, Montreal. s323-29.

Qin, X., Emerson, J., Stapp, J., Stapp, L., Abe, P., Burns, J.L., 2003. Use of Real-Time PCR with Multiple Targets To Identify *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermenting Gram-Negative Bacilli from Patients with Cystic Fibrosis. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2003, p. 4312–4317.

Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata T., and Hiramatsu K., 2010. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci J. Clin. Microbiol, 48(3):765.

Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. s101-119.

The Gram-Positive Cocci: Part I: Staphylococci and Related Organisms: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott, s539-565, s786-798.

Thong, K.L., Lai, M.Y., Teh, C.S.J. and Chua, K.H., 2011. Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR. *Tropical Biomedicine* 28(1): 21–31

Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., A. Baschkier, A., Rivas, M., Iwanaga M., 2003. Multiplex PCR assay for identification of human Diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology,, June , p. 2669–2671.

- Topçu, Z., 2007. Moleküler Biyoloji, Biyoinformatik ve Temel Teknikler. Biyokimya ve Moleküler Biyolojide Modern Teknikler, (Editörler: Telefoncu, A., Erbil, M. K., Zihnioglu, F., Kılınç, A.) Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. s271-289.
- Tünger, A., Çavusoglu, C., Korkmaz, M., 2003. Mikrobiyoloji, Asya Tıp Yayıncılık, izmir. s41-50.
- Ustaçelebi, Ş., 1999 Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara Güneş Kitabevi Ltd. Şti., s349-363
- Ünal, S., 2004. *Staphylococcus aureus*: Direnç Mekanizmaları. Ulusoy S,Usluer G, Ünal S. Gram-pozitif bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, s23-38.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J., 1996. Polyhasic taxonomy, a consensus approach to a bacterial systmatics. *Microbio Rev.* 60, 407-438.
- Van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H. F., Vos, M. C., Tümler, B., Segand, C., Reubsæet, F., Verbrugh, H., and Van Belkum, A., 1999. Identification of Burk holderis spp. In the clinical microbiology: comprasion of conventional and molecular methods. *J. Clin. Microbiol*, 2158-2164.
- Waldvogel, FA., 2000. *Staphylococcus aureus*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. (Editörler: Mandell, GL., Bennett, JE., Dolin, R.). New York: Churchill Livingstone, s2069-2091
- White, B A., 1993. PCR Protocols: Current Methods and Applications for DNA Amplification, Humana Press, Totowa New Jersey.
- Vierstraete, A., <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, Erişim Tarihi: 01, 05, 2012.
- Wilkinson, B.J., 1997. Biology.The Staphylococci in Human Disease (Editörler: Crossley, K., Archer, G.L.), Newyork, Churchill Livingstone Inc., s1-38.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, et al. Gram-positive cocci. In Koneman's Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. pp. 672–764, 2006.

Yorgancıgil, B., 1999. Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. Turgut Ozal Tıp Merkezi Dergisi, Sayı 6(2), s176-82.

ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİ

Adı Soyadı	Seda GÜVENÇ
Adres	Kahramanmaraş Üniversitesi Çocuk Servisi
Telefon	0507 771 23 49
E-mail	guvencseda@yahoo.com
Medeni Hal	Bekâr
Doğum Tarihi	25.08.1986

ÖĞRENİM DURUMU

YÜKSEK LİSANS

Üniversite	Kahramanmaraş Üniversitesi
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilimdalı	Tıbbi Mikrobiyoloji

LİSANS

Üniversite	Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Yüksek Okul	Sağlık Yüksekokulu
Bölüm	Hemşirelik

MESLEKİ DENEYİMİ

2009-2012 tarihinden itibaren KSÜ Tıp Fakültesi Hastanesinde Cerrahi Yoğun bakım, Kalp ve Damar Cerrahi Yoğun Bakım ve Yenidoğan Yoğun Bakım ünitelerinde hemşire olarak çalıştım.

Mayıs 2012 tarihinden itibaren Adıyaman tıp fakültesi hastanesinde hemşire olarak çalışmaktayım.

İLGİ ALANLARI

Kitap okumak, gezi, yüzme

