

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİDOĞAN SEPSİSLERİNE NEDEN OLAN BAŞLICA ÜÇ BAKTERİ
TÜRÜNÜN, HIZLI VE GÜVENİLİR TANISI AMACIYLA
EŞ ZAMANLI PCR TEKNİĞİ GELİŞTİRİLMESİ**

Haldun DOĞAN

**Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ**

**Ankara
2009**

Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ danışmanlığında, Haldun DOĞAN tarafından hazırlanan bu çalışma 27/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ *İmza* :

Üye : Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU *İmza* :

Üye : Prof. Dr. Aykut ÖZKUL *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Çetin KOCAEFE *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA
Enstitü Müdürü

Yenidoğan sepsislerine neden olan başlıca üç bakteri türünün, hızlı ve güvenilir tanısı amacıyla eş zamanlı PCR tekniği geliştirilmesi.

ÖZET

Yenidoğan sepsisi, yenidoğan servislerinin günümüzde karşılaştığı en büyük problemlerden bir tanesidir. Bunun sebepleri arasında yenidoğan sepsisinin sık görülmesi, belirtilerinin özgül olmaması, yüksek sensitivite ve yüksek spesifiteye sahip bir tanı metodunun olmaması, ölüm oranının yüksek olması ve tedaviye başlamadaki ufak bir gecikmenin bile, ölüm oranını daha da arttırması gösterilebilir.

Sepsisin tanısında altın standart kültürdür (Sankar vd 2008). Ancak kültür geç sonuç veren bir metottur. Bu nedenle sepsis olduğundan şüphelenilen, ancak sepsis olmayan bir yenidoğanda, sepsis hızlı bir şekilde elimine edilememekte ve yerine konulamaz bir kaybı önlemek için vakit kaybedilmeden antibiyotik tedavisine başlanmaktadır. Aynı zamanda kültür metodunun yanlış negatif oranı yüksektir (Gerdes 2004). İşte bu nedenledir ki, kültür sonucunun negatif çıkması durumunda dahi, sepsis belirtileri kuvvetli ise, her ihtimale karşı antibiyotik tedavisine devam edilebilmektedir. Tanıdaki bu yetersizliklerden dolayı birçok yenidoğan, sepsis olmadığı halde sepsis tedavisi görmekte; yenidoğan servislerini işgal ederek ve gereksiz yere antibiyotik olarak maddi kayba yol açmaktadır.

Bu çalışmada eş zamanlı PCR platformunda hidroliz problemleri kullanılarak, yenidoğan sepsisinin tanısına yönelik; hızlı, güvenilir ve esnek bir yaklaşım geliştirilmiştir. Önemli üç sepsis etkeni olarak çalışmaya dahil edilen *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* için reaksiyon başına 100 bakteriden az, *Enterococcus faecalis* için ise 10 bakteriden az bir deteksiyon limitine ulaşılabilmektedir.

Anahtar kelimeler: Yenidoğan, sepsis, eş zamanlı PCR, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*

Establishment of a Real-time PCR method for rapid and reliable detection of three main bacteria causing sepsis in neonates.

ABSTRACT

Neonatal sepsis is one of the major problems in neonatal services of the hospitals. The reasons for this are: the high frequency of the neonatal sepsis, common non-specific symptoms, the unavailability of a diagnostic test with high sensitivity and specificity, high mortality rate and even further increment in the mortality rate by any delay in medical treatment.

Golden standard in the diagnosis of sepsis is culture (Sankar vd 2008). But culturing is a slow procedure. Therefore in the case of any suspicion of sepsis in a non-sepsis neonate, the elimination of the possibility of disease cannot be achieved rapidly, therefore antibiotic treatment is started immediately to avoid any possible unreplacable loss. Also the rate of the false negative results is high in culturing (Gerdes 2004). Because of this reason, in the case of strong sepsis symptoms, antibiotic treatment is carried on although the culture test results are negative. As a result of these insufficiencies in the diagnosis of neonatal sepsis, a huge number of neonates are mistreated with antibiotics and occupy neonatal intensive care units unnecessarily, causing an economical loss.

In this study; a rapid, reliable and flexible method is developed for the diagnosis of neonatal sepsis, using Real-time PCR platform and hydrolysis probes. As three major sepsis agents chosen in this study; a detection limit of less than 100 bacteria for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and a detection limit of less than 10 bacteria for *Enterococcus faecalis* are achieved.

Key words: neonatal, sepsis, Real-time PCR, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans çalışması yapmam gerektiğini bana göstererek bu çalışmayı yapmamı sağlayan, beni öğrenciliğine layık görerek danışmanlığına kabul eden, dört senedir gerek iş hayatımda gerekse yüksek lisans öğrenimimde bilgi ve tecrübesi ile bana yol göstererek ihtiyaç duyduğumda desteğini karşılık beklemezsiniz benden esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Bilgi ve tecrübeleri ile bana uzun süredir yol gösteren, yaptığım bu çalışmada da gerek her ihtiyaç duyduğumda benden yardımlarını esirgemeyerek gerek laboratuvarlarını bana açarak bu çalışmayı yapmamı sağlayan çok değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Serdar CEYLANER ve Sayın Uz. Dr. Gülay CEYLANER'e,

Bu çalışmanın yapılması için maddi kaynağı sağlayan TÜBİTAK'a,

Bilgi ve tecrübesi ile bana yardımcı olan Sayın Uz. Dr. Serdar TUNCER'e,

Bakterileri kültürlerini sağlayan Sayın Uz. Dr. Ülkü TIRAŞ ve Sayın Uz. Dr. Ayşe Esra KARAKOÇ'a,

Yüksek lisans öğrenimimin değişik aşamalarında benden arkadaşlık ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Eda ÖZDEMİR, Filiz OĞAN ÇETİNKAYA ve Nilgün TEKİN'e,

Her konuda benim için en iyisini isteyen ve bunun için elinden geleni yapan aileme,

En içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 Sepsis	3
2.1.1 Yenidoğan Sepsisi.....	5
2.1.1.1 Erken Yenidoğan Sepsisi	6
2.1.1.2 Geç Yenidoğan Sepsisi	7
2.1.1.3 Yenidoğan Sepsisinin Önemi	8
2.1.1.4 Yenidoğan Sepsisine Neden Olan Mikroorganizmalar	10
2.1.1.4.1 Bakteriler	10
2.1.1.4.2 Mantarlar	11
2.1.1.4.3 Virüsler.....	12
2.1.1.4.4 Bu Çalışmada Seçilen Türler	12
2.1.1.4.4.1 <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.1.4.4.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	13
2.1.1.4.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.2 Tanı Metodları	14
2.1.2.1 Kültür	15
2.1.2.2 Lomber Ponksiyon	16
2.1.2.3 Bakteriyel antijenleri hedef alan testler.....	16
2.1.2.4 Sepsis belirteçleri.....	17
2.1.2.4.1 Septik Tarama	17
2.1.2.5 Moleküler Genetik	18
2.1.2.5.1 16S rRNA	19
2.2 PCR.....	20
2.2.1 Yarı-Kantitatif PCR	25
2.2.2 Eş zamanlı PCR	26
2.2.2.1 Eş zamanlı PCR Tespit Yaklaşımları.....	27
2.2.2.1.1 Çift Zincir DNA Boyaları.....	27
2.2.2.1.2 TaqMan (Hidroliz) Probları.....	28
2.2.2.1.3 Hibridizasyon (Melezleme) Probları.....	29
2.2.2.1.4 Moleküler Beacons (Moleküler İşaret/Fener).....	30
2.2.2.1.5 Scorpions (Akrepler).....	31
2.3 Sepsiste Koruyucu Önlemler ve Tedavi	32
2.3.1 Koruyucu Önlemler	32
2.3.2 Tedavi.....	33
2.3.2.1 Antibiyotik.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1 Materyal	35
3.1.1 Bakterilerin Eldesi	35
3.1.2 PCR Optimizasyonu ve Eş Zamanlı PCR'ın Denenmesi İçin Materyal.....	35
3.1.3 Kandan Bakteri Titrasyon Çalışması İçin Materyal	35

3.1.3.1 Bakteri Yoğunluğunun Tespiti	35
3.1.3.2 Bakteri Yoğunluk Titrasyonunun Hazırlanması.....	36
3.1.3.3 Titrasyon Örneklerinin Hazırlanması.....	36
3.2 Yöntem.....	37
3.2.1 DNA İzolasyonu	37
3.2.1.1 PCR Optimizasyonu ve Eş Zamanlı PCR'ın Denenmesi İçin DNA İzolasyonu	37
3.2.1.2 Kan İçinden Titrasyon Çalışması İçin DNA İzolasyonu.....	37
3.2.2 Eş zamanlı PCR.....	38
3.2.2.1 16S rRNA Geni Dizilerinin Eldesi	38
3.2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	38
3.2.2.1.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	39
3.2.2.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	39
3.2.2.2 Korunmuş/Korunmamış Bölgelerin Tespiti	39
3.2.2.2.1 Tür İçi Heterojenitenin Kontrolü	39
3.2.2.3 Tasarım.....	40
3.2.2.3.1 Primerler	40
3.2.2.3.2 Problar	41
3.2.2.3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	41
3.2.2.3.2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	42
3.2.2.3.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	42
3.2.2.3.2.4 Raportör ve Baskılayıcılar	43
3.2.2.4 Reaksiyon Koşulları	43
3.2.2.4.1 PCR Optimizasyonu.....	43
3.2.2.4.2 PCR Optimizasyonunun Doğrulanması	44
3.2.2.4.3 Eş Zamanlı PCR'ın Denenmesi	45
3.2.2.4.4 Kan İçinden Titrasyon Çalışması.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	48
4.1 Bakteri Yoğunluğu Ölçümü Sonuçları	48
4.2 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları.....	48
4.3 PCR Optimizasyonu Sonuçları.....	52
4.4 PCR Optimizasyonunun Doğrulanmasının Sonuçları	52
4.5 Eş Zamanlı PCR Denenmesinin Sonuçları	53
4.5.1 C _t Değerleri	56
4.6 Kan İçinden Titrasyon Çalışmasının Sonuçları.....	57
4.6.1 C _t Değerleri	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	60
5.1 Tasarlanan Yarıştırmalı Problar Ve Özgüllük Performansları	60
5.2 Deteksiyon Alt Limitleri	61
5.3 Kod Çözme Yaklaşımı (Decoding)	64
5.4 TÜBİTAK Projesi ve İleri Çalışmalar.....	66
5.5 Sonuç.....	68
KAYNAKLAR.....	69
EKLER.....	74
EK 1: <i>Escherichia coli</i> 16S rRNA Geni Dizisi	74
EK 2: <i>Enterococcus faecalis</i> 16S rRNA Geni Dizisi	75
EK 3: <i>Staphylococcus aureus</i> 16S rRNA Geni Dizisi	76
EK 4: Korunmuş/Korunmamış Bölgelerin Tespiti İçin Dizi Hizalama Sonuçları	77
EK 5: Primer Dizileri ve Primer Tasarım Raporu	81
EK 6: Şekil 4.4'teki Jel Görüntüsünün Aslı.....	82

ÖZGEÇMİŞ.....	83
---------------	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 PCR'ın şekilsel gösterimi.....	22
Şekil 2.2 PCR'ın fazları	25
Şekil 2.3 Çift zincir DNA boyaları	27
Şekil 2.4 Hidroliz problemleri.....	29
Şekil 2.5 Hibridizasyon problemleri.....	30
Şekil 2.6 Moleküler beacons.....	31
Şekil 2.7 Scorpions.....	32
Şekil 3.1 Eş zamanlı PCR tasarımı.....	40
Şekil 3.2 <i>E. coli</i> için prob tasarımı ve primerler ile birlikte dizi üzerinde gösterimi.....	41
Şekil 3.3 <i>E. faecalis</i> için prob tasarımı ve primerler ile birlikte dizi üzerinde gösterimi....	42
Şekil 3.4 <i>S. aureus</i> için prob tasarımı ve primerler ile birlikte dizi üzerinde gösterimi.....	42
Şekil 4.1 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları – <i>E. coli</i>	49
Şekil 4.2 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları – <i>E. faecalis</i>	50
Şekil 4.3 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları – <i>S. aureus</i>	51
Şekil 4.4 PCR optimizasyonu jel görüntüsü.....	52
Şekil 4.5 PCR optimizasyonunun doğrulanmasının jel görüntüsü.....	53
Şekil 4.6 Eş zamanlı PCR denemesinin sonuçları – Turuncu kanal.....	54
Şekil 4.7 Eş zamanlı PCR denemesinin sonuçları – Yeşil kanal.....	54
Şekil 4.8 Eş zamanlı PCR denemesinin sonuçları – Sarı kanal.....	55
Şekil 4.9 Kan içinden titrasyon çalışmasının sonuçları (<i>E. coli</i>).....	57
Şekil 4.10 Kan içinden titrasyon çalışmasının sonuçları (<i>E. faecalis</i>).....	58
Şekil 4.11 Kan içinden titrasyon çalışmasının sonuçları (<i>S. aureus</i>).....	58
Şekil 5.1 Üç bakteri için prob dizilerinin hizalanması.....	60
Şekil 5.2 Gerçek sepsis vakası – Yeşil kanal.....	66
Şekil 5.3 Gerçek sepsis vakası – Sarı kanal.....	67
Şekil 5.4 Gerçek sepsis vakası – Turuncu kanal.....	67
Şekil 5.5 Gerçek sepsis vakası – Kırmızı kanal.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Türkiye’de yapılan bir çalışmada tespit edilen bakteriler.....	11
Çizelge 2.2 Septik taramada bakılan belirteçler ve anormal değerleri.....	18
Çizelge 3.1 10^8 bakteri / ml yoğunluktaki standart süspansiyonların hazırlanması.....	36
Çizelge 3.2 Bakteri yoğunluk titrasyonu için örneklerin hazırlanması.....	36
Çizelge 3.3 Problar için kullanılan raportör, baskılayıcı ve raportörün kanalı.....	43
Çizelge 3.4 PCR optimizasyonu reaksiyon koşulları.....	44
Çizelge 3.5 PCR optimizasyonu termal döngü koşulları.....	44
Çizelge 3.6 PCR optimizasyonunun doğrulanması için termal döngü koşulları.....	45
Çizelge 3.7 Eş zamanlı PCR’ın denemesi için reaksiyon koşulları.....	46
Çizelge 3.8 Eş zamanlı PCR cihazının kanal ayarları.....	46
Çizelge 3.9 Eş zamanlı PCR cihazının termal döngü ayarları.....	46
Çizelge 4.1 Spektrofotometrik ölçüm sonuçları.....	48
Çizelge 4.2 Bakteri süspansiyonlarının 600 nm’deki optik yoğunlukları.....	48
Çizelge 4.3 Eş zamanlı PCR denemesinde elde edilen C_t değerleri.....	56
Çizelge 4.4 Kan içinden yapılan titrasyon çalışmasında elde edilen C_t değerleri.....	59
Çizelge 5.1 Üç kanallı, iki deteksiyonlu örnek kod çözme yaklaşımı.....	65

SİMGELER DİZİNİ

BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
bp	Baz Çifti (Base Pair)
C	Sitozin
CFU	Koloni Oluşturma Birimi (Colony Forming Unit)
CONS	Koagülaz Negatif Stafilokoklar
CP	Kesişme Noktası (Crossing Point)
CRP	C Reaktif Protein
C _T	Eşik Döngü (Threshold Cycle)
dATP	Deoksi Adenozin Trifosfat
dCTP	Deoksi Sitozin Trifosfat
dGTP	Deoksi Guanozin Trifosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Trifosfat
dTTP	Deoksi Timin Trifosfat
dUTP	Deoksi Urasil Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
G	Guanin
GBS	Grup B Streptokok
HSV	<i>Herpes simplex</i> virüsü
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
kb	Kilo Baz
LPA	latex particle agglutination
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NEC	Nekrotizan Enterokolit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribo Nükleik Asit
RPM	Dakikadaki Dönme Sayısı (Rotation Per Minute)
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
UNG	Urasil-N-Glikozilaz
UV	Mor Ötesi (Ultra Violet)

1. GİRİŞ

Sepsis, bir enfeksiyona karşı vücudun vermiş olduğu zararlı sistemik tepki olarak tanımlanabilir (Del Vecchio vd 2004). Sepsis enfeksiyon ile birlikte kana çok sayıda inflamasyon ajanı salınması sonucunda akut inflamasyon reaksiyonu sonucunda ortaya çıkar (Anonim 2008a). Sepsis günümüzde dahi ölüm oranı yüksek bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Sepsiste kanda mutlaka sepsis ajanının bulunduğu kabul edilir (Anonim 2008a). Ancak bazı durumlarda, sepsis ajanının kanda az miktarda bulunmasından ve/veya tanı metodunun bunu belirleyememesinden dolayı sonuç negatif elde edilebilmektedir (Mathur 1996).

Yenidoğanlarda görülen sepsis vakaları ise; özgül belirtilere sahip olmaması, yüksek duyarlılık (sensitivite) ve yüksek özgünlüğe (spesifiteye) sahip bir tanı metodunun bulunmaması nedeniyle ve tedaviye başlamada gecikme yaratması sonucunda, ölüm oranını daha da arttırması gibi sebeplerden dolayı; yenidoğan servislerinin karşılaştığı en büyük sorunlardan biridir (Gerdes 2004; Mtitimila ve Cooke 2004).

Yenidoğan sepsisi, erken yenidoğan sepsisi ve geç yenidoğan sepsisi olarak ikiye ayrılır. Erken yenidoğan sepsisine doğum öncesinde veya sırasında karşılaşılan bir mikroorganizma sebep olur. Geç yenidoğan sepsisinde ise genellikle sepsis ajanı doğumdan sonra çevreden bulaşır (Vergnano vd 2005).

Sepsis vakalarına sebep olan mikroorganizmalar sıklıkla bakterilerdir. Ancak seyrek te olsa mantarlar ve virüsler de sepsise yol açabilirler. Bu mikroorganizmaların dağılımı ülkenin ekonomik durumuna ve sepsisin erken yenidoğan sepsisi veya geç yenidoğan sepsisi olmasına göre değişiklik göstermekle beraber, genel olarak bakterilerden *Klebsiella* türleri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, CONS (koagülaz negatif stafilokoklar), Group B *streptococcus* ve *Enterococci*; mantarlardan *Candida* türleri ve virüslerden de HSV (*Herpes simplex* virüsü) sepsis ajanı olarak karşımıza çıkar.

Sepsis tanısında kültür yöntemi yanlış pozitif sonuç verme oranının çok düşük olması ile altın standart olarak kabul ediliyor olmasına rağmen, % 20'den fazla yanlış negatif sonuç verdiği göz önüne alınarak bu testin tanıda mükemmeliyeti temsil eden altın standartta

olmadığı göz ardı edilmemelidir. (Gerdes 2004). Aynı zamanda 2-5 günlük sonuç süresi ile, zamanın son derece önemli olduğu yenidoğan sepsisi için büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, yenidoğan sepsisi tanısında kullanılmak üzere daha güvenilir ve hızlı tanı metotlarına ihtiyaç vardır. Moleküler tanı metotlarının bu soruna çözüm getireceği düşünülmektedir.

Sepsis vakalarında kullanılmak için geliştirilecek tanı sisteminde özellikle yanlış negatif sonuç verme oranı, sıfır veya sıfıra çok yakın olmalıdır. Zira sepsisin belirtilerinin özgül olmaması sonucunda, sepsis olmayan çok sayıda yenidoğan için sepsisten şüphelenilmekte ve gerçek sepsis vakaları toplam şüphelenilen vakalar içerisinde azınlık olarak kalmaktadır. Yanlış negatif oranı sıfır olan bir tanı metodu ile test sonucu negatif çıkan örnekler için sepsis şüphesi ortadan kalkacak ve bu hastaların gereksiz yere tedavi olmaları önlenmiş olacaktır. Aynı zamanda tanıda sepsis ajanının ve varsa antibiyotik direncinin belirlenmesi çok önemlidir. Zira yenidoğana verilecek antibiyotiğin seçiminde bu bilgiler kritik rol oynamaktadır.

PCR (Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu) moleküler genetikte en sık kullanılan metotlardan birisidir. Bu yöntem kısaca, kalıp DNA üzerinde istenilen bir bölgenin, canlı dışında enzimatik olarak çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Çok güçlü bir yöntem olan PCR, farklı yaklaşımlarla çok çeşitli uygulamaların temelini oluşturmaktadır.

PCR temelli tekniklerden birisi Eş Zamanlı PCR'dır (Real-Time PCR). Eş zamanlı PCR yaklaşımlarında floresan boyalar veya floresan işaretli kısa DNA parçaları (oligo) kullanılmak sureti ile solüsyon içerisindeki kalıp DNA'nın mutlak veya bağıl miktar tayini yapılabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, eş zamanlı PCR tekniklerini kullanarak, yenidoğan sepsisinin tanısına yönelik hızlı, güvenilir ve esnek bir yaklaşım geliştirmektir. Bu çalışmada yenidoğan sepsisinde sıklıkla görülen üç bakteri olan *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* örnek organizma olarak seçilmiştir. Eş zamanlı PCR yaklaşımı olarak hidroliz problemleri seçilmiş ve yarıştırmalı olarak kullanılmış, bu sayede çoklu test yapılması (multiplex) olanağı sağlanmış ve özgüllük artırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Sepsis

Sepsis, kana çok sayıda inflamasyon ajanı salınması sonucunda oluşan sistemik belirtiler ile birlikte ortaya çıkan akut inflamasyon reaksiyonunun eşlik ettiği bir enfeksiyondur. Akut pankreatitis ve yanıkların da içinde bulunduğu büyük travmalarda da sepsis belirtileri oluşabilir. İnflamatuar reaksiyonda aşağıdaki belirtilerin en az ikisi görülür (Anonim 2008a):

- Vücut sıcaklığı $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$
- Kalp atışı > 90 atış/ dk
- Nefes sıklığı > 20 nefes/dk veya $\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg
- Beyaz hücre sayısı $> 12,000$ hücre/ μL veya < 4000 hücre/ μL veya $> \% 10$ immatur formlar

Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şokta; vücut bakteriyel, fungal veya viral (Caviness vd 2008; Anonim 2008b) enfeksiyona karşı bir inflamatuvar yanıt verir. Bu yanıt sonucunda oluşan bulgular arasında titreme, ateş, düşük tansiyon, idrar miktarında azalma, ve konfuzyon vardır. Akciğer, böbrek ve karaciğerlerde akut organ yetmezlikleri oluşabilir. Tedavi metotları arasında canlandırma (resussitasyon), antibiyotik tedavisi, enfekte dokunun cerrahi müdahale ile çıkartılması veya irinin temizlenmesi ve destekleyici bakım sayılabilir (Anonim 2008a).

Şiddetli sepsis, sepsis ile birlikte en az bir organda yetmezlik oluşmasıdır (Anonim 2008a).

Septik şokta ise şiddetli sepsis ile beraber ilk sıvı tedavisine çok az tepki veren organların hipoperfuzyonu ve hipotansiyonu da gözlenir (Anonim 2008a).

Mortalitesi yüksek olan sepsis, şiddetli sepsis ve septik şokun mortalite yüzdeleri ABD için sırasıyla %15, %20 ve %40 olarak verilmiştir (Anonim 2008a).

Sebebi çoğunlukla bakteriler olan sepsis, nadiren de olsa *Candida* türleri veya diğer mantarlar sebebi ile de oluşabilmekte ve daha çok yenidoğanlarda, gebelerde ve 35 yaş üzerindekielerde görülebilmektedir (Anonim 2008a).

Birçok durumda sepsise sebebiyet veren ajanı tespit etmek güçtür (Mathur 1996). Bu sebeple bireyde olası bir enfeksiyona karşı bir sistemik tepki görüldüğü zaman, sepsis olduğu düşünülür, mutlaka bakteriyemi veya vücutta enfeksiyonlu bir bölge tespit edilmesine gerek yoktur. Ancak kan kültürleri veya diğer tanı metotları ile bakteri varlığı saptanırsa, sepsis tanısı doğrulanmış ve kaynağı olan bakteri tespit edilmiş olur (Mathur 1996).

Bakteriler kan dolaşımına karıştığı zaman, bir takım mekanizmalar, bakterileri yok etmek için harekete geçer. Bakteriler genellikle monosit – makrofaj sistemi tarafından yok edilirler. Fakat bazen sistemik inflamatuvar tepki ortaya çıkıp orijinal enfeksiyondan bağımsız olarak gelişebilir (Mathur 1996). Sistemik inflamatuvar tepkinin verilmesi, vücudun yabancı organizmayı tanımlamasına bağlıdır. Bu tepki her ne kadar mikroorganizmaların elimine edilmesine yardımcı olsa da, bunun bir sonucu olarak vücut bir miktar doku hasarına maruz kalır (Mathur 1996). Daha önceleri dokular üzerindeki hasara bakterilerin kendisinin veya endotoksinlerinin (gram pozitifler için lipoteikoik asit – peptidoglikan kompleksleri) sebebiyet verdiği düşünülse de; sonraki çalışmalar bakteriyel enfeksiyonların fizyolojik etkilerine, büyük oranda, damar bölgelerinde bulunan mikroorganizmalara tepki olarak aktive edilen pro-inflamatuvar sitokinlerin sebebiyet verdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu sitokinler arasında bulunan tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin-1 (IL-1), sepsis durumunda makrofajlar, endotel hücreler ve daha birçok farklı hücre tarafından hızla üretilirler (Mathur 1996). Sepsisli çocuk ve yenidoğanlarda IL-1, IL-6 ve TNF seviyelerinde artış gözlenmiştir (Mathur 1996). Mast hücrelerinden ve bazofillerden salınan histamin, düz kasların kasılmasını, kapiller geçirgenliğin artmasını ve dolayısıyla düşük tansiyonu körükler (Mathur 1996). Nötrofiller, fagositoz ile mikroorganizmaları öldürmeye başladıkları zaman aynı zamanda çevrelerine proteolitik enzimler ve serbest oksijen radikallerini de salarlar. Bu da çevrelerindeki dokunun hasar görmesine, sıkı endotelial hücre bağlantılarının gevşemesine, kılcal damar sızıntısı oluşmasına ve sonuç olarak ta septik şoka sebebiyet verebilir (Mathur 1996).

2.1.1 Yenidoğan Sepsisi

Yenidoğan sepsisi yaşamın ilk 30 – 90 gününde gerçekleşen invaziv bakteriyel bir enfeksiyondur. Yüksek ölüm oranına sahiptir ve çok ani olarak ortaya çıkar (Taskin vd 2004; Anonim 2008b). Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı % 0,2 – 14 arasındadır (Taskin vd 2004). Tedavi alandaki gelişmelere rağmen hala ölümcüllüğünü korumaktadır (Taskin vd 2004). Yenidoğan sepsisinin tanısı klinik olarak ve/veya mikrobiyolojik olarak yapılabilir (Vergnano vd 2005). Yenidoğan sepsisinin erken dönemdeki belirtileri genelde güç fark edilir ve özgün değildir. Sepsisi olan bir yenidoğanda aşağıdaki bulgulardan bir ya da birkaçı görülebilmektedir (Gerdes 2004; Sankar vd 2008; Anonim 2008b):

- Düşük veya yüksek ateş
- Letarji, zayıf ağlama, emme kaybı
- Zayıf perfüzyon, uzamış kılcıl damar yeniden dolun süresi
- Hipotoni, yenidoğan reflekslerinin olmaması
- Bradi/taşikardi
- Solunum sıkıntısı, apne ve soluma güçlüğü
- Hipoglisemi/ Hiperglisemi
- Metabolik asidoz

Sistemlere özgü belirtiler (Sankar vd 2008; Anonim 2008b):

- Merkezi sinir sistemi: Kabarık ön fontanel, boş bakış, yüksek sesle ağlama, aşırı duyarlılık, sersemlik/koma, nöbet, başını geriye atma (bu bulgular aynı zamanda menenjit şüphesini de uyandırır.)
- Kalp/ Damar: Düşük tansiyon, zayıf perfüzyon, şok
- Gastrointestinal: Yemek tahammülsüzlüğü, kusma, ishal, abdominal şişme, parolitik ileus, nekrotizan enterokolit (NEC)
- Hepatik: Hepatomegali, direkt hiperbilirubinemi (özellikle idrar yolu enfeksiyonlarında)
- Renal: Akut renal yetmezlik
- Hematolojik: Kanama, peteşi, purpura
- Deri: Pistül, apse, sklerema, döküntü, umbilikal kızarıklık ve akıntı.

Yenidoğan sepsisi 0,5- 8/ 1000 doğum sıklıkla görülür. Düşük doğum ağırlığı, solunum bozukluğu veya konjenital anomalisi olan ve maternal perinatal risk faktörlerini taşıyan yenidoğanlarda daha sık görülür. Erkeklerde görülme oranı, kızlara oranla iki kat fazladır. Bakteriyel ajan ile karşılaşma doğumdan sonra olabileceği gibi, erken membran rüptürü, plasenta previa (plasentanın aşağı yerleşimli olması), abruptio plasenta (erken plasenta ayrılması), gebelik toksemisi, hızlı doğum veya annede enfeksiyon olduğu durumlarda (özellikle idrar yolu veya endometriyum enfeksiyonlarına bağlı ateşin, doğumdan az önce veya doğum sırasında gözlemlendiği durumlarda), doğum öncesinde veya doğum sırasında da olabilir (Anonim 2008b). Erken doğumlarda görülme oranı, zamanında doğumlara göre daha yüksektir (Mathur 1996). Mortalite yüzdesi % 15 ile % 40 arasındadır (Anonim 2008b).

2.1.1.1 Erken Yenidoğan Sepsisi

Literatürde erken yenidoğan sepsisinin çıkış zamanı hakkında çelişkiler vardır; değişik kaynaklarda belirtilen çıkış zamanı, doğumdan sonraki ilk 48 saat ile 7 gün arasında değişiklik göstermektedir (Mtitimila ve Cooke 2004; Vergnano vd 2005; Sankar vd 2008; Anonim 2008b). Bazı kaynaklarda da ilk 24 saatte çıkan sepsise çok erken yenidoğan sepsisi, 24 saat ile 6 gün arasına erken yenidoğan sepsisi ve 6. günden sonra çıkan sepsise de geç yenidoğan sepsisi adı verilmektedir (Vergnano vd 2005). Vakaların yarısı doğumdan sonraki ilk 6 saatte, büyük çoğunluğu ise doğumdan sonraki ilk 72 saatte ortaya çıkar (Vergnano vd 2005; Anonim 2008b). Başka bir kaynağa göre de vakaların % 90'ında, doğumdan sonraki ilk 24 saatte en az bir bulgu ortaya çıkarken, geri kalan % 10'luk dilimde ise doğumdan sonraki ilk 48 saatte ortaya çıkmaktadır (Gerdes 2004). Genelde doğum öncesi veya doğum sırasında karşılaşılan bir ajan sebep olur (Gerdes 2004; Vergnano vd 2005; Anonim 2008b). Bu tür enfeksiyon geçişlerine dikey geçiş denir (Mtitimila ve Cooke 2004; Sankar vd 2008). Transplasental geçiş bunlardan biridir; bakterinin plasentadan fetüse geçmesi ile olan nadir bir olaydır. Doğum yaklaştıkça koryon ve amniyon zarlarının mikroorganizmalar için bariyer özelliklerinde azalma olur ve dikey geçiş enfeksiyonu gerçekleşebilir. Bu şekilde görülen enfeksiyonlardaki en sık görülen ajanlar GBS (Grup B Streptokok) ve *Escherichia coli*'dir (Mtitimila ve Cooke 2004; Sankar vd 2008). Doğum sırasındaki enfeksiyonlar ise daha sık görülür (Sankar vd 2008).

ve doğum esnasında fetüs vajinal kanaldan geçerken değişik mikroorganizmalarla karşılaşması sonucunda olur (McCoy 2001; Vergnano vd 2005; Sankar vd 2008). Erken yenidoğan sepsisindeki riski arttıran faktörler (Gerdes 2004; Sankar vd 2008):

- Düşük doğum ağırlığı (<2500 g.) veya prematüre doğumlar.
- Doğumdan 2 hafta öncesine kadar annede bakteriyel enfeksiyon nedeniyle görülen ateşli hastalık.
- Mekonyum aspirasyonu ve mekonyum ile boyalı amniyon sıvısı
- Uzamış membran rüptürü >18-24 saat
- Doğum sırasında tek steril olmayan veya üçten fazla steril vajinal muayene
- Uzun süren doğum (doğumun 1. ve 2. aşamalarının toplamının 24 saatten fazla sürmesi).
- Perinatal asfiksi (Apgar skoru 1. dakikada < 4)
- Koryoamniyonit/ annede ateş
- Annede group B Streptococcus (GBS) enfeksiyonu.
- Annede idrar yolu enfeksiyonu
- Erkek bebek

Mekonyum aspirasyonu tek başına veya yukarıdaki herhangi üç maddenin bir arada bulunması, antibiyotik tedavinin başlaması için yeterlidir (Sankar vd 2008). Erken membran rüptürü ile beraber iki tane daha risk faktörünün bulunması sepsis riskini 25 kat artırır (Gerdes 2004). Group B Streptococcus (GBS) enfeksiyonu bulunan annelere doğumdan yaklaşık 4 saat kadar önce antibiyotik verilmelidir (Gerdes 2004).

2.1.1.2 Geç Yenidoğan Sepsisi

Literatürde geç yenidoğan sepsisinin çıkış zamanı hakkında çelişkili bilgiler vardır; değişik kaynaklarda çıkış zamanı doğumdan sonraki ilk 48 saatten sonrası ile doğumdan sonraki ilk 7 günden sonrası arasında değişiklik göstermektedir (Mtitimila ve Cooke 2004; Vergnano vd 2005; Sankar vd 2008; Anonim 2008b). Genelde doğum sonrası çevreden kaynaklanan enfeksiyonların sonucu olarak oluşur (Vergnano vd 2005; Sankar vd 2008;

Anonim 2008b). Bu şekilde hastane ortamından yenidoğana bulaşan enfeksiyonlar için de yatay geçişli enfeksiyonlar denir (McCoy 2001; Vergnano vd 2005).

Ölüm oranı gelişmekte ve gelişmiş olan ülkeler arasında erken ve geç yenidoğan sepsisinde farklılık gösterir; gelişmiş ülkelerde geç yenidoğan sepsisinde koagülaz negatif stafilokok (CONS) sıklıkla görülmektedir. Buna ek olarak CONS'un tedavisi daha kolay olduğu için geç yenidoğan sepsisinin ölüm oranı daha düşük seyretmektedir. Gelişmekte olan ülkelere ise durum tersidir, genelde geç yenidoğan sepsisindeki ölüm oranı daha yüksektir (Vergnano vd 2005). Geç yenidoğan sepsisi için hastane kaynaklı olanlardaki riski arttıran faktörler (Sankar vd 2008):

- Düşük doğum ağırlığı (<2500 g.) veya prematüre doğumlar.
- Yoğun bakımda yatma
- Mekanik ventilasyon
- İnvaziv girişimler
- Parenteral sıvı alımı
- Şok solüsyonlarının kullanımı

Hastane dışından bulaşan geç yenidoğan sepsislerindeki riski arttıran faktörler:

- Düşük hijyen
- Kötü kordon bakımı
- Biberonla beslenme
- Prelaktal besinler

Emzirme ise enfeksiyondan korunmada yardımcıdır (Sankar vd 2008).

2.1.1.3 Yenidoğan Sepsisinin Önemi

Bebek ölümleri, özellikle gelişmekte olan ülkelerin en büyük problemleri arasında yer almaktadır. Bu ölümlerin büyük çoğunluğunu yenidoğan ölümleri, yenidoğan ölümlerinin de büyük çoğunluğunu sepsisin de içinde bulunduğu enfeksiyonlar oluşturmaktadır (% 25-

50) (Mathur 1996; Vergnano vd 2005; Sankar vd 2008). Gelişmekte olan ülkelerde yenidoğan ölümleri 34/1000 sıklıkta gözlenmektedir (Vergnano vd 2005).

Yenidoğan sepsisinin tanı ve tedavisi, yenidoğan ünitelerinin en yoğunlukla yaptığı işlerdendir. Bazı hastanelerin yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde yatan bebeklerin % 25'i sepsis şüphesi ile yatmaktadır (Gerdes 2004). Yenidoğan sepsisinde tanı ve tedavi stratejilerinin belirlenmesi aşağıdaki sebeplerden dolayı zordur (Gerdes 2004; Mtitimila ve Cooke 2004):

- Yenidoğan sepsisinin belirtileri ve bulguları hastalar arasında değişkenlik gösterir ve özgün değildir, belirti ve bulgularını diğer yenidoğan problemlerinin belirti ve bulgularından ayırmak zordur,
- İyi tanı metotları mevcut değildir,
- Ölüm oranı yüksektir,
- Yenidoğanın bağışıklık sistemi yeterince gelişmemiştir,
- Tedaviye başlamadaki gecikme ölüm oranını arttırdığı için en ufak bir şüphede dahi antibiyotik bazlı tedaviye başlandığından, gereksiz tedavi yaygındır. Bu da dirençli hastane enfeksiyonlarının sıklığını arttıran faktörlerden birisidir.

Klinik bulgulardan hareketle sepsisten şüphelenilen ve antibiyotik tedavisine başlanan her 11-23 yenidoğandan yalnız birinin yenidoğan sepsis teşhisi kültür ile doğrulanabilmektedir (Gerdes 2004). Bu da hastaların büyük bir bölümünün gereksiz yere tedavi olduğunu göstermektedir.

Tanıda kullanılan testlerden kültür, yavaştır ve duyarlılığı düşüktür. Beyaz küre sayımı gibi bir takım belirteç testlerinin ise pozitif tahmin oranı maksimum % 40 kadardır (Gerdes 2004).

Aynı zamanda yenidoğan sepsisi için tanı alanında güçlü metotlar olmadığından, uygulama alanında çok farklı yaklaşımlar tavsiye edilmektedir; mesela klinik olarak sepsis bulguları taşıyan ancak kan kültürü negatif olan yenidoğanlar için, literatürde tavsiye edilen gözetim süresi, 2 günden, 7 güne veya daha uzun bir süreye kadar değişebilmektedir (Gerdes 2004).

Yenidoğan sepsisi, Asya'da her 1000 canlı doğumda 7,1-38, Afrika'da her 1000 canlı doğumda 6,5-23, Güney Amerika ve Karayipler'de ise her 1000 canlı doğumda 3,5-8,9 dur. Gelişmiş olan ülkeler ile karşılaştıracak olursak, Amerika ve Avustralya'da her 1000 canlı doğumda 6-9 civarındadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, hastane ortamında doğum yapmama oranı yüksek olması ve bildirim azlığından dolayı, istatistiklerdeki rakamların gerçek rakamlardan yaklaşık % 20 kadar düşük çıktığı tahmin edilmektedir (Vergnano vd 2005). Mortalite oranları da dünya çapında değişiklik gösterir ve genelde gelişmekte olan ülkelerde, gelişmiş ülkelere oranla daha yüksektir; ancak gelişmiş ülkelerde de düşük değildir. (örnek: ABD'de % 15-40; Hindistan'da %40-65 (Mathur 1996)).

Düşük doğum ağırlığına sahip yenidoğanlarda ölüm oranı daha yüksektir. Enfeksiyon etkeni ajan da ölüm oranını etkileyen bir diğer faktördür (Vergnano vd 2005). Örnek olarak; 1500 g'ın altında ağırlığa sahip yenidoğanlar içinde, Grup B Streptokok kaynaklı erken yenidoğan sepsisinin mortalite oranı neredeyse % 100 ilen, aynı oran 2500 g'ın üzerindeki yenidoğanlarda %20 civarındadır (Mathur 1996).

2.1.1.4 Yenidoğan Sepsisine Neden Olan Mikroorganizmalar

2.1.1.4.1 Bakteriler

Sepsisin en sık görülen sebepleridir. Yenidoğan sepsisine sebep olan bakteriler, Dünya'nın değişik bölgelerinde değişik sıklıklar ile görülmektedir; yenidoğan sepsisin türüne ve ülkenin sosyo-ekonomik düzeyine göre değişmektedir (Mathur 1996; Taskin vd 2004).

Gelişmekte olan ülkelerde gram negatif bakteriler en büyük çoğunluğu oluşturmaktadır. Bu bakteriler içinde en sık görülenler ise *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* ve *Salmonella*'dır (Mathur 1996; Vergnano vd 2005). Gram pozitif organizmalardan ise *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar (CONS), *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes* en sık görülenleridir (Vergnano vd 2005). Group B *streptococcus* ise ender olarak görülmektedir (Mathur 1996).

Gelişmiş ülkelerde ise erken yenidoğan sepsisinde en sık GBS ve *E. coli*, geç yenidoğan sepsisinde ise en sık CONS, GBS ve *S. aureus* görülür (Gerdes 2004; Vergnano vd 2005).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, 89 pozitif kan örneğinin bakteri dağılımı ve yüzdeleri Çizelge 2.1’deki gibidir (Taskin vd 2004):

Çizelge 2.1 Türkiye’de yapılan bir çalışmada tespit edilen bakteriler

Bakteri	Sayı	Yüzde
<i>S. aureus</i>	35	39
<i>E. coli</i>	18	20
Coagulase (-) <i>staphylococci</i>	10	11
<i>Klebsiella</i>	10	11
<i>Enterococci</i>	9	10
<i>Pseudomonas</i>	4	5
Diğer	3	4
Toplam	89	100

Bu verilere göre, yenidoğan sepsisine neden olan bakteriler açısından Türkiye, gelişmekte olan ülkelere daha çok benzemektedir.

Transplasental geçişe sahip enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan mikroorganizmalar ise *Treponema pallidum* ve *Listeria monocytogenes*’dir (Mtitimila ve Cooke 2004; Sankar vd 2008).

2.1.1.4.2 Mantarlar

Bakterilerin sebep olduğu yenidoğan sepsis vakalarına oranla daha seyrek görülse de, mantarlar da sepsise yol açabilmektedir. En yaygın olarak görülen sepsis ajanı mantarlar *Candida* türleridir (Rao ve Ali 2005; Anonim 2008b). Hindistan’da yapılan başka bir çalışmada, toplam sepsis vakalarının %10,9’unun sebebinin *Candida* türleri olduğu ortaya çıkmıştır (Kumar ve Neelagund 2006). *Candida* türleri aynı zamanda düşük doğum ağırlığına sahip yenidoğanlarda görülen sepsis vakalarının % 12-13’ünden sorumludur

(Rao ve Ali 2005). *Candida* türleri arasında en sık görülenler *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'tir ve yapılan bir çalışmada her birinin, CONS kaynaklı sepsis vakaları ile aynı sıklıkta olduğu tespit edilmiştir (Benjamin vd 2000). Hindistan'da yapılan diğer bir çalışmada ise *Candida tropicalis*, % 40 ile en sık görülen *Candida* türü olarak belirtilmiştir. Bu da *Candida tropicalis*'in Dünyanın bazı yerlerinde daha yaygın olarak görüldüğünü düşündürmektedir. *Candida* türleri içinde, *Candida lusitaniae* gibi daha nadir görülen sepsis ajanları da vardır (Sanchez ve Cooper 1987). Bunun dışında yenidoğanda sepsise sebep olabilen çok sayıda mantar türü içinden, *Torulopsis glabrata* (Reich vd 1997), *Hansenula anomala* (Ma vd 2000), *Cryptococcus laurentii* (Cheng vd 2001) ve *Trichosporon asahii* (Téllez-Castillo vd 2008) örnek olarak gösterilebilir.

2.1.1.4.3 Virüsler

Bakterilerin ve mantarların sebep olduğu yenidoğan sepsis vakalarına oranla çok daha nadir görülse de, virüsler de sepsise veya sepsise benzer bulgulara yol açabilmektedir. Sepsise yol açabilen virüsler arasında, başta *Herpes simplex* virüsü (HSV) olmak üzere (Overall 1994; Caviness vd 2008), *Influenza B* virüsü (Yusuf vd 2007), *Echovirus 6* (Ventura vd 2001), *Dengue* virüsü (Phongsamart vd 2008), *Parechovirus* (Verboon-Maciolet vd 2008), *Enterovirus* (Verboon-Maciolet vd 2008) gibi virüsler gösterilebilir.

2.1.1.4.4 Bu Çalışmada Seçilen Türler

2.1.1.4.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, yaklaşık 3 milyon nükleotitten oluşan halka biçimli bir kromozoma sahip olan çubuk şeklinde, gram negatif bir bakteridir (Wiley 2002). *Enterobacteriaceae* familyasının tipik bir üyesi olarak, insan ve hayvan bağırsaklarının normal florasının bir parçasıdır. K₂ vitamini üreterek ve patojenik bakterilerin bağırsakta üremesini engelleyerek organizmaya fayda sağlar. Fakültatif anaerobiktir ve spor oluşturmaz (Bentley ve Meganathan 1982; Kubitschek 1990; Sussman 1997).

Önceleri bağırsakta yaşayan ve çok düşük virülense sahip, kommensal bir bakteri olduğu düşünülürken, zaman içinde insanda *E. coli*'nin bazı suşlarına bağlı olarak gelişen şiddetli bağırsak enfeksiyonlarının gözlemlenmesi sonucunda, bu düşüncede değişiklik olmuştur (Sussman 1997).

Elde edilmesi ve yetiştirilmesi kolay olduğundan ve genetiği basit olduğundan üzerinde en çok bilimsel çalışma yapılan prokaryotik model organizmadır. Bu sebeple hakkında en çok bilgiye sahip olunan mikroorganizma olduğu söylenebilir.

2.1.1.4.4.2 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis, insanların ve diğer memelilerin bağırsaklarında bulunan kommensal, gram pozitif ve fakültatif anaerobiktir bir bakteridir. Ancak bu bakteri özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olabilmekte ve ölüme sebebiyet verebilmektedir (Ryan vd 2003).

1984 yılına kadar *enterococci*, *Streptococcus* cinsi içinde yer alıyordu ve *E. faecalis*, *Streptococcus faecalis* olarak isimlendiriliyordu (Ludwig vd 1985).

Birçok antibiyotik türüne dirençli suşları bulunabilen *E. faecalis*'in en çok yaygın olanı vankomisine dirençli olan VRE'dir (Vancomycin-resistant *enterococcus*) (Dixon vd 1985; Amyes 2007).

2.1.1.4.4.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus; fakültatif anaerobik, küresel, gram pozitif bir bakteridir. İnsan vücudunun deri, burun gibi bazı yerlerinde kommensal olarak bulunabilir (Kluytmans vd 1997; Salyers ve Whitt 2002). İnsanda, içinde deri enfeksiyonları, pnömoni, menenjit, toksik şok sendromu gibi hastalıkların bulunduğu çok geniş bir yelpazede hastalığa yol açabilir.

S. aureus, birçok gıda zehirlenmesinin de sebebi olarak gösterilmiştir (Dworkin ve Falkow 2006).

S. aureus dünya çapında önemli bir hastalık nedenidir. Antibiyotiklerin keşfinden önce, genellikle sonu ölüm ile biten enfeksiyonlara sık sık neden oluyordu. Penisilinin keşfi ve kullanımı ile hastalardaki prognoz önemli ölçüde azalmış olmasına rağmen birkaç sene içinde bakteride penisiline karşı direnç görünmeye başlanmıştır. Bunun üzerine metisilin kullanılmaya başlanmış, ancak bir müddet sonra da MRSA (Metisiline Dirençli *S. aureus*) suşu ortaya çıkmıştır. Kısa zamana kadar da MRSA, hastane enfeksiyonlarında en yaygın görülen ajan olarak kalmıştır (Ji 2007).

2.1.2 Tanı metotları

İdeal olarak, tanı için kullanılacak herhangi bir metodunun yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuç oranının düşük olması istenmektedir. Ancak yenidoğan sepsisi için böyle bir metot şu an için mevcut değildir (Gerdes 2004; Mishra vd 2006); kullanılan birçok yöntemin düşük pozitif tahmin oranı vardır. Bunun sonucu olarak nihayetinde klinisyen, tüm klinik bulguları, test sonuçlarını ve perinatal geçmişi önüne koyup, sepsis mi değil mi diye karar vermek durumunda kalmaktadır (Gerdes 2004). Yenidoğan sepsisinde az veya hiç tedavi edilmemenin sonuçları, çok veya gereksiz tedavi edilmenin sonuçlarına göre çok daha şiddetli olduğu için tanı için kullanılan metotlarda, yanlış pozitif oranının düşük olduğu yüksek spesifiteden ziyade, yanlış negatif oranının düşük olduğu yüksek duyarlılık aranmaktadır (Mishra vd 2006). % 100 duyarlılığı olan bir test sepsis kuşkusu olan ancak test sonucu negatif çıkan yenidoğanlara güven içinde antibiyotik tedavi başlamamanın yolunu açacaktır (Mishra vd 2006).

Tanıda sepsisin varlığı ile beraber, sepsis ajanının ne olduğunun ve varsa antibiyotik direncinin tespiti de, tedaviye yön vereceği için çok önemlidir.

2.1.2.1 Kültür

Kan kültürü steril olarak alınmış 0,5-1 ml kanın standart triptik soya buyyon kültür şişelerine alınması ile gerçekleştirilen ve tüm hastane laboratuvarlarında uygulanabilen standart bir metottur. Kültür 5 gün kadar inkübe edilir. Ancak modern kültür sistemleri erken yenidoğan sepsisine sebep olan ajanların çoğunu 48 saat içinde tanımlayabilmektedir (Gerdes 2004).

Vücut sıvılarında sepsis etkeninin izole edilmesi sepsis tanısı için en özgün metottur. Bu sebeple sepsis tanısında altın standart olarak adlandırılmaktadır (Sankar vd 2008). Ancak en kullanışlı metot olan kan kültürü, aynı zamanda altın standart olamayacak kadar yanlış negatif sonuç vermektedir (Gerdes 2004). Kan kültürünün duyarlılığı en çok % 50-80 olarak verilmektedir. Bu oran otopsi ile sepsis olduğu kanıtlanan yenidoğanların, geriye dönülüp kan kültürü negatif mi pozitif mi diye araştırıldığı zaman, en fazla % 80'inin pozitif olarak tespit edilmesi ile hesaplanmıştır (Gerdes 2004). Yani bakteriyel sepsiste kan kültürü negatif çıkabilmektedir (Mathur 1996). Annenin antibiyotik kullanması ile erken yenidoğan sepsisinde bu oranın daha da azaldığı düşünülmektedir (Gerdes 2004). Kısacası pozitif kan kültürü yenidoğan sepsisini doğrularken, negatif kan kültürü yenidoğan sepsisi olasılığını ortadan kaldıramamaktadır (Gerdes 2004). Yine de kan kültürünün pozitif tahmin oranı çok yüksek olduğundan ve daha iyi bir alternatifi olmadığından, sepsis şüphesi olan her durumda antibiyotik tedavisi başlamadan önce yapılması gerekir. Aynı zamanda sepsis ajanının kan kültürü ile izolasyonu sayesinde, ajan ve antibiyotik hassasiyeti/direnci hakkında bilgi edinilip, antibiyotik tedavisine yön verilebildiği için, kan kültürünün önemi artmaktadır.

Öneminden dolayı kan kültürü için kan alınırken uygun prosedürün izlenmesi çok önemlidir (Sankar vd 2008):

- Kanı alacak kişi eğitilmiş olmalı ve steril eldiven giymeli
- Kanın alınacağı 5 cm çapındaki bölge, önce alkol ile ve sonra povidone-iodine ile sonra tekrar alkol ile temizlenmelidir. Povidone-iodine dairesel olarak ve dıştan içe olacak şekilde uygulanmalıdır.
- Deri 1 dk kadar kurumaya bırakılmalıdır.
- 1 ml kan yeterlidir.

2.1.2.2 Lomber Ponksiyon

Lomber ponksiyon, beyin omurilik sıvısının (BOS) alınması için, sırttan, omurgalar arasından omurga iğnesi ile girilerek gerçekleştirilen girişimsel bir metottur. Menenjit tanısı için yaygın olarak yapılmaktadır. BOS kültürü yapılarak bakteri için pozitif olup olmadığı tespit edilir. Lomber ponksiyon ile alınan BOS'tan yapılan kültür, kan kültürüne göre daha güvenilirdir. Zira menenjit vakalarında BOS, kana göre daha yüksek yoğunlukta bakteri içerir.

Yenidoğan sepsisleri içinde menenjitin oranı, % 0,3 ile % 3 arasında verilmektedir. Menenjit ile sepsisin belirtileri çakışmaktadır ve bazı durumlarda aynı anda da görülebilmektedir (Sankar vd 2008).

Özellikle geç yenidoğan sepsisinde antibiyotik başlanmadan önce lomber ponksiyon yapılması gerektiği bildirilmiştir. Kritik durumdaki yenidoğanlarda lomber ponksiyon yapılması ertelenebilir (Sankar vd 2008). Bir diğer görüşe göre lomber ponksiyon uygulamasını standart olarak yapmak verilmesi zor bir karardır. Çünkü çok sık görülmeyen menenjiti bir yenidoğanda tespit edebilmek için 1000 ila 2000 arasında menenjit belirtisi gösterip kan kültürü negatif çıkan yenidoğana lomber ponksiyon yapmak gerekmektedir (Gerdes 2004).

2.1.2.3 Bakteriyel antijenleri hedef alan testler

Her ne kadar bu alanda yapılmış ilk çalışmalar umut vermiş olsa da, sonraki çalışmalar LPA testinin (latex particle agglutination) sensitivitesinin % 67 kadar düşük olduğunu ve pozitif tahmin oranının %56 olduğunu göstererek, bir tanı testinden beklenen kriterlerin altında olduğunu ortaya koymuştur (Gerdes 2004). LPA testi her ne kadar tarama testi olarak kullanılabilse de, daha düşük maliyetli tarama testleri mevcuttur (Gerdes 2004).

2.1.2.4 Sepsis belirteçleri

Sepsis belirteçleri, sepsis durumunda miktarı değişen parametrelerdir. Şu ana kadar çok sayıda parametre belirlenmesine rağmen, hiçbiri tek başına kullanılacak kadar yüksek spesifisite ve sensitiviteye sahip değildir. Ancak içlerinden CD11b, CD64, interlökin-6 ve interlökin-8 gibi gelecek için umut vadedenler vardır (Ng ve Lam 2006).

Sepsis belirteçleri şu şekilde gruplanabilir (Ng 2004):

- Kan değerleri
- Akut faz proteinleri ve diğer proteinler
- Kompleman sistemin bileşenleri
- Kemokin, sitokin ve birleştirici moleküller
- Hücre yüzeyi belirteçleri
- Diğer belirteçler

Sepsis belirteçleri tek başlarına yeterli olmadıkları için, sensitivite ve spesifisiteyi arttırmak amacı ile birlikte değerlendirilme eğilimi vardır (Arnon ve Litmanovitz 2008). Bu kombinasyonlardan biri ise Septik Tarama'dır (Septic Screen).

2.1.2.4.1 Septik Tarama

Septik tarama, sepsis vakalarında genellikle değişim gösteren bir takım belirteçlerin, beraber değerlendirilmek üzere yenidoğanda ölçülmesidir. Sepsisten şüphelenilen yenidoğanlarda yapılması tanıya yardımcı olabilir. Septik taramada bakılan belirteçler ve anormal değerleri Çizelge 2.2'deki gibidir (Sankar vd 2008):

Çizelge 2.2 Septik taramada bakılan belirteçler ve anormal değerleri

Belirteç	Anormal Değeri
Toplam lökosit sayımı	< 5000/mm ³
Mutlak nötrofil sayımı	Zamanında doğan bebekler için Manroe skalası (Ng 2004) ve çok düşük ağırlıklı bebekler için Mouzinho skalası (Arnon ve Litmanovitz 2008)
Olgunlaşmamış nötrofillerin tüm nötrofillere oranı	> 0,2
Mikro-eritrosit sedimentasyon hızı	> 1 saatte 15 mm
C reaktif protein (CRP)	>1 mg/ dl

Septik taramadaki belirteçlerden 2 veya daha fazlasının anormal olması ile %93-100 sensitiviteye, %83 spesifiteye ulaşıldığı belirtildiği için, yenidoğanda 2 veya daha fazla anormal belirteç olması durumlarında antibiyotik tedavisine başlanması şiddetle tavsiye edilmektedir. Ancak klinik olarak yüksek sepsis şüphesi varsa, septik tarama sonuçları aksini gösterse dahi antibiyotik başlanmalıdır (Sankar vd 2008).

Bu belirteçler içinde CRP'nin pozitif tahmin oranı %93-100 arası verilmiştir. Ancak CRP'nin doruk noktasına (normalin 1000 katı bir değere ulaşabilmektedir) ulaşması enfektif süreç veya doku hasarından altı ile sekiz saat sonra ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple CRP için yenidoğan sepsisinin spesifik fakat geç belirteci denmektedir (Mishra vd 2006).

2.1.2.5 Moleküler Genetik

Mikroorganizmaların tiplendirilmelerinde en güçlü, etkin ve güvenilir yaklaşımlardan biri DNA temelli yöntemlerdir. Yeni bakteri tür veya izolatlarının, tanımlanmasında klasik mikrobiyal tanı yaklaşımlarının ardından mutlaka uygulanması gereken yöntem, filogenidir.

Yenidoğan sepsisinin tanısındaki bu zorluğa, moleküler genetik tekniklerin çözüm getireceği beklenmektedir. Golden ve diğerlerinin (2004) yapmış olduğu bir çalışmada, GBS genomuna özgü *cfb* geni hedef alınarak tanıda % 100 spesifite ve % 100 sensitivite

sağlanabilmiştir. Bu testte bakteriler, 100 kopya alt sınırına kadar kolaylıkla tespit edilebilmiştir (Mishra vd 2006).

16S rRNA geni hedef alınarak yapılan PCR analizi ile, yüksek sensitiviteli geniş kapsamlı bir tanı metodu oluşturmak, klinik laboratuvar uygulamalarında zor bir olaydır. Zira 16S rRNA bölgesi yüksek miktarda korunmuşluğa sahiptir ve reaksiyonda kullanılan reaktifler içinde bulunan, az miktarda kalıntı bakteriyel DNA, pozitif sonuca sebebiyet verebilir (Mishra vd 2006). Bu kalıntı DNA, özellikle bakterilerden izole edilen ve PCR reaktiflerinden olan *Taq* polimerazdan kaynaklanabilmektedir (Reesink vd 2008). Bu sebeple klasik PCR ile elde edilen tespit sınırının 10^3 - 10^4 kopya/ml civarında olduğu belirtilirken, eş zamanlı PCR ile 5-50 kopya/ml tespit sınırına sahip olan teknikler geliştirilebileceği bildirilmiştir (Mishra vd 2006).

PCR reaksiyonu içerisinde bulunan kontamine bakteriyel DNA'yı azaltmak/ yok etmek için metotlar geliştirilmiştir. Bunlardan bir kısmı, daha önceki reaksiyonlardan bulaşabilecek ampliconları elimine etmek amaçlıdır. Bunlar arasında 8-metoksipsoralen ve UV ışık kullanımı gösterilebilir (Reesink vd 2008). Bir diğeri de Kox ve ark. bildirdiği PCR içerisinde dTTP yerine dUTP kullanıp, reaksiyondan önce reaksiyon karışımını urasil-N-glikozilaz (UNG) ile inkübe etmektir; UNG çift zincir DNA'yı urasil nükleotidi olan yerden kestiği için, daha önceki reaksiyonlardan kaynaklanabilecek kontaminasyonları gidermede etkilidir (Lindahl vd 1977; Reesink vd 2008). Ancak bu metotların hiçbiri, özellikle düşük kopya sayılı bir tespit amaçlandığında tek başına etkili olamamaktadır, çünkü *Taq* polimeraz kaynaklı bakterial genom kontaminasyonunu hedef almamaktadır. Bakteriyel genom kontaminasyonunu da hedef alan diğer bir metot olan PCR karışımının ultrafiltrasyonu ise, düşük kopya sayısı için çok etkili değildir (Reesink vd 2008).

2.1.2.5.1 16S rRNA

16S rRNA geni, yaklaşık 1500 baz uzunluğunda, 23S ve 5S rRNA genlerini de içeren rRNA operonu içinde yer alan bakteriyel bir gendir (Sachse ve Frey 2003). Çok popüler olan bu gen için, sadece GenBank® veri tabanına 33 binden fazla dizi girilmiştir (Sachse ve

Frey 2003). Popülaritesinin bu kadar yüksek olmasının sebebi, bakteriler arasında yüksek korunmuşluk oranına sahip olması ve aynı zamanda kolayca dizilenecek bir uzunlukta olmasıdır. Bu sebeple bakterilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır; korumuş bölgelerden yapılan PCR ile çoğaltılan bölge içindeki korumamış bölgelerden faydalanılarak bakteriler filogenetik olarak tanımlanabilmektedir (Sachse ve Frey 2003).

16S rRNA gen analizi, klinik örnekler içinde bulunan bakterilerin tanımlanması için de kullanılabilir. Bu genin bakteri genomundaki kopya sayısının 10'dan fazla olabilmesi, özellikle düşük bakteri yoğunluğuna sahip olabilen klinik örneklerdeki bakteriyel kontaminasyonun teşhisini mümkün hale getirmektedir. 1992 senesinde, hayvanlardan insanlara geçerek enfeksiyona yol açan *Yersinia enterocolitica*, geliştirilen bir metotla kırmızı kan hücreleri içinde 5000 bakteri/ml bir hassasiyet ile tespit edilebilmiştir (Reesink vd 2008). Daha sonraları 16S rDNA hedef alınarak aynı bakteri için hassasiyet, eş zamanlı PCR ile 30 CFU/ ml'ye kadar indirilebilmiştir (Reesink vd 2008). Yapılan diğer bir çalışmada ise 5 ayrı bakteri türünün teşhisini hedefleyen, eş zamanlı çoklu PCR metodu ile, enfeksiyon 12-16 bakteri/ ml hassasiyette tespit edilebilmiştir (Reesink vd 2008).

16S rRNA'nın bu avantajlarına rağmen, bakterileri tanımlamada dikkat edilmesi gereken durumlar olabilir; *Riemerella anatipestifer*'de olduğu gibi tür içinde heterojenite olabilir (Sachse ve Frey 2003) veya *Mycoplasma bovis*/ *Mycoplasma agalactiae*'de veya *Bacillus anthracis*/ *Bacillus cereus*/ *Bacillus thuringiensis*'te olduğu gibi, yakın ama farklı türlerde görülebilen yüksek benzerlik, tanımlamalarda hatalara yol açabilir (Sachse ve Frey 2003).

2.2 PCR

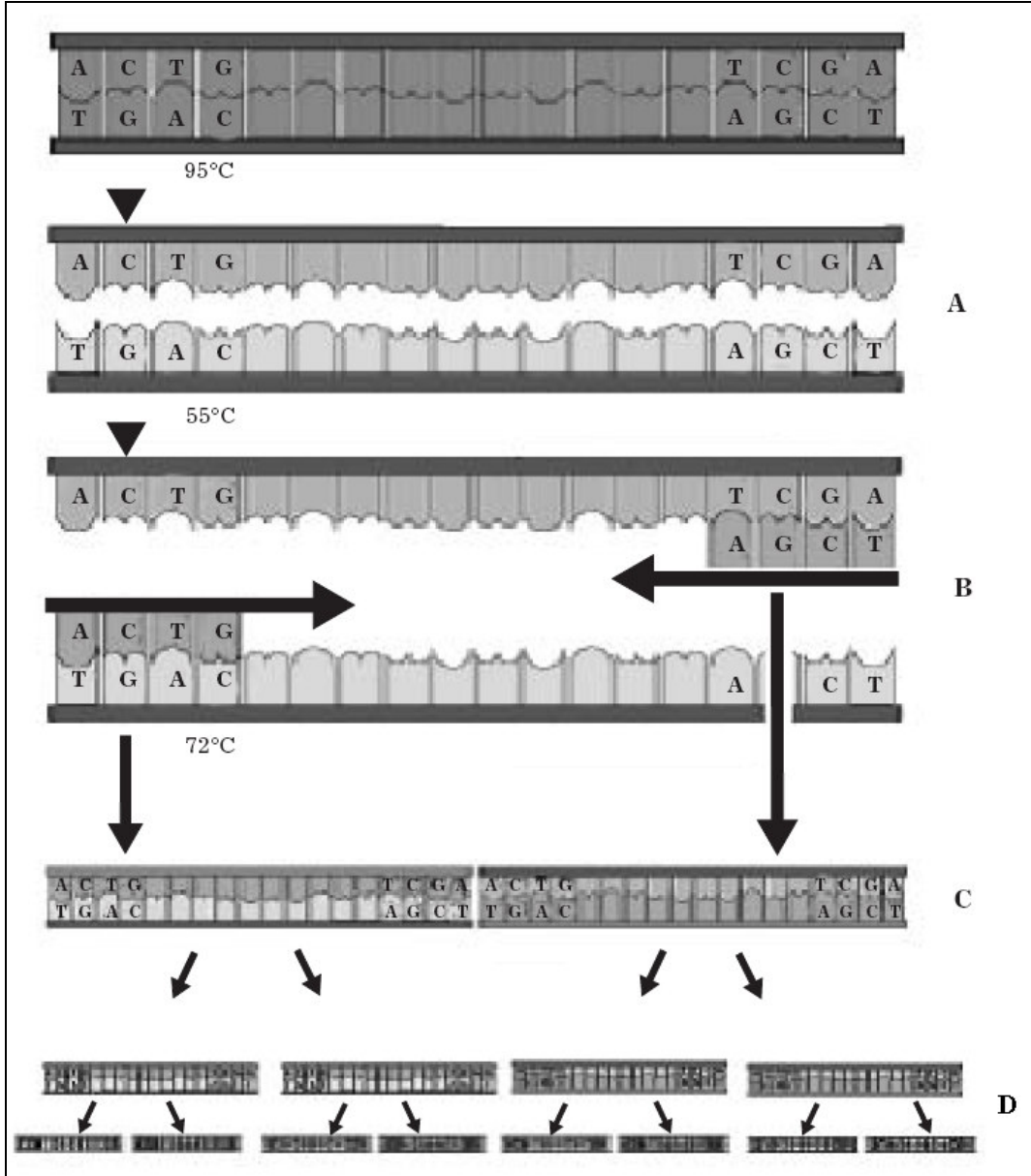
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. İlk olarak Kary Mullis bu tekniğe bugünkü ismini vermiş ve uygulamaya koymuştur ve bu fikri ile 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır (Birben 2006).

PCR Nükleik asit dizilerinin canlı dışında, kolay bulunan bir ekipman ile, kısa bir süre içerisinde, yüksek miktarda çoğaltılmasına olanak tanır. Bu sebeple keşfinden sonra birçok uygulamanın önünü açmıştır ve yaygın olarak kullanılmasına sebep olmuştur. Moleküler genetikteki devrim niteliğindeki buluşlardan biridir. Daha önce DNA çoğaltılması için kullanılan klonlamaya göre çok daha hızlı, basit ve esnektir (Mullis vd 1986; Gibbs 1990). PCR, DNA'nın üstel olarak artmasını sağlar ve teorik olarak sadece 20 döngüde 1 milyon kez çoğalma sağlanabilir. Isıya dayanıklı DNA polimeraz enziminin kullanılması, PCR için otomasyonun kolayca uygulanmasını sağlamıştır (Sylvänen vd 1988; Lo 1998).

PCR için hücre bölünmesi sırasındaki DNA replikasyonunun basit bir şeklidir denebilir. PCR basitçe üç olayın bir döngü halinde tekrarlanmasından oluşur (Şekil 2.1) (Lo 1998):

- Denatürasyon (Denaturation) (DNA'nın tek zincire ayrılması): Isı ile sağlanır. Artan ısı DNA'nın iki zincirini bir arada tutan, moleküller arası hidrojen bağlarını kırar ve iki zincir birbirinden ayrılır.
- Primer bağlanması (Annealing): DNA polimerazın polimerizasyon yapabilmesi için açık 3' OH grubu olması gerekmektedir. Bu da primer denilen sentetik DNA molekülleri tarafından sağlanır. Primerler aynı zamanda çoğaltılacak yeri belirleme görevinde de bulunurlar. Bir PCR için, farklı zincirlerde olacak şekilde 2 adet primer tasarlanır.
- Uzatma (Extension): DNA polimerazın polimerizasyonu gerçekleştirdiği aşamadır. DNA polimeraz, solüsyonda bulunan dATP, dTTP, dCTP veya dGTP moleküllerinden diziyeye gelmesi gerekeni primerden başlamak üzere bağlar.

Bu üç aşama 25-45 kez tekrarlanır. Her döngü sonunda teorik olarak amplikon miktarı iki kat artsa da, pratikte PCR'in verimliliğine göre bu oran daha düşüktür. Ancak yine de logaritmik (üssel) bir artış görülür.



Şekil 2.1 PCR'in şekilsel gösterimi (Birben 2006). (A) Sıcaklığı arttırılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. (B) Sıcaklığın düşmesi ile primerlerin bağlanması ve uzatma gerçekleşir. (C) Yeni oluşan iki zincir. (D) Bu artış üssel olarak devam eder

Polimerizasyon ile DNA miktarındaki artış, primer dizilerinin arasında gerçekleşir. Ortaya çıkan primerler ile sınırlanmış küçük DNA parçalarına ise ampikon denir.

Primer Tasarımında dikkat edilmesi gerekenler (Bartlett ve Stirling 2003):

- Konum: Primerlerin kalıp DNA üzerindeki konuları, yapılacak uygulamaya göre seçilmelidir. Ancak her durumda çoğaltılmak istenen yer ileri ve ters primerlerin arasında olmalıdır.
- Amplikon Büyüklüğü: Amplikonlar genel olarak 100 ile 1000 baz çifti uzunluğunda olsa da, amplikon büyüklüğü bu rakamlarla sınırlı değildir. 1000 baz çiftinden büyük amplikonlarda bir takım zorluklar karşılaşılabilmese de, çok daha uzun bölgelerin PCR'ını yapmak mümkündür. 100 baz çiftinden küçük amplikonlar oluşturmak ta mümkündür, gerçekte küçük amplikonun getirdiği bir dezavantaj olmadığı için sadece primerlerden oluşan amplikonlar oluşturmak ta mümkündür. Primerlerin konumu amplikonun büyüklüğünü belirleyeceği için, amplikonların büyüklüğü de yapılacak uygulamaya göre belirlenmelidir denilebilir.
- Guanin / Sitozin içeriği: iyi primerler genel olarak %40 ile %60 arasında Guanin / Sitozin içeriğine sahiptir. Ancak Guanin / Sitozin içeriği sadece tercih için bir avantajdır, bu oranların dışına da çıkılabilir.
- Erime Sıcaklığı: Bir DNA dizisinin erime sıcaklığı, dizinin yarısının çift zincir yarısının tek zincir olduğu sıcaklık olarak tanımlanabilir. PCR'da kullanılacak primerlerin erime sıcaklığı için kesin bir rakam verilememek ile birlikte, dikkat edilmesi gereken durumlar; primerlerin DNA'ya bağlanabildiği sıcaklıkta DNA polimerazın aktif olması ve iki primerin de erime sıcaklıklarının aynı veya çok yakın olmasıdır.
- Saç Tokaları: DNA için saç tokası; tek zincir DNA molekülü içinde birbirini tamamlayıcı bölgelerin olmasından dolayı, molekülün kendi üzerinde katlanarak saç tokasına benzer bir yapı oluşturmasıdır. Primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamaları gerekmektedir, çünkü bu yapıdaki primerin, kalıp DNA üzerine melezlenerek (hybridization) polimerizasyonu başlatma verimliliği düşüktür. Aynı zamanda şayet saç tokası yapısında 3' ucu eşlenik bölge içindeyse ve 5' uç fazlalığı varsa, polimerizasyon saç tokası üzerinde gerçekleşeceği için primerin dizisi bozulacak ve hiç verim alınamayacaktır.

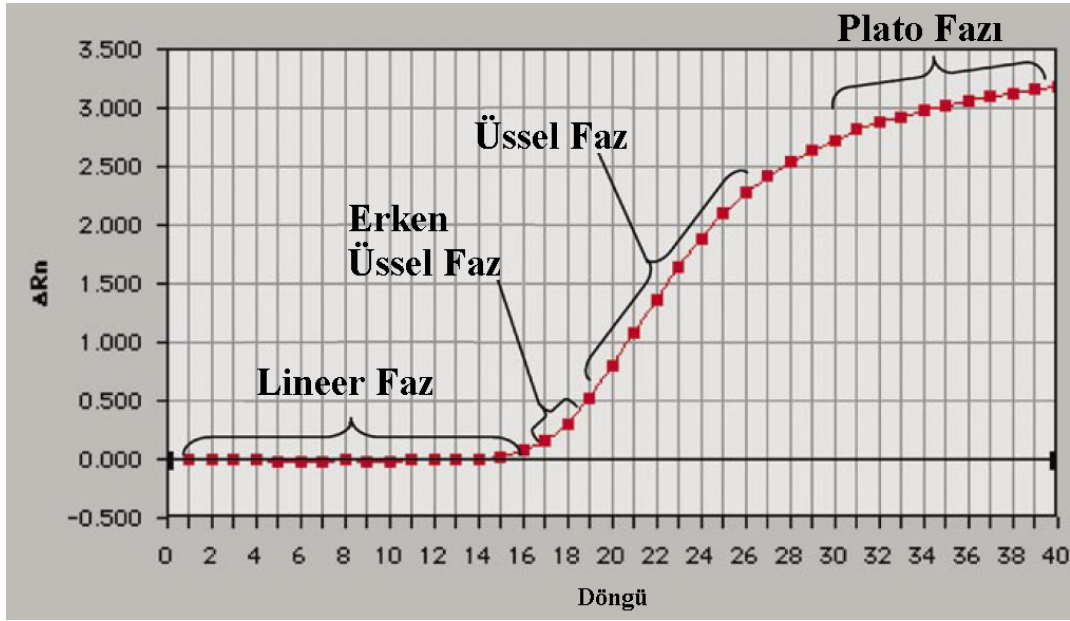
- Primer-Dimer'ler: İki primer içinde birbirini eşlenik bölgelerin olmasından dolayı, primerlerin birbirleri üzerine melezlenerek (hybridization) bağlanmaları ile oluşan yapılardır. Primerlerin dimer oluşturmamaları gerekmektedir, çünkü bu yapıdaki primerlerin, kalıp DNA üzerine melezlenerek (hybridization) polimerizasyonu başlatma verimliliği düşüktür. Aynı zamanda şayet primer dimer yapısında 3' ucu eşlenik bölge içindeyse ve 5' uç fazlalığı varsa, polimerizasyon primer dimer üzerinde gerçekleşeceği için primerin dizisi bozulacak ve hiç verim alınamayacaktır.
- Özgüllük: Primerler kalıp DNA üzerinde sadece istenilen bölgeyi çoğaltmalı, bu sebeple primerlerin özgüllüğü kontrol edilmelidir. Aynı zamanda uzun primerler kullanmak, primerlerin özgüllüğünü arttıracaktır.

PCR ile genellikle 10 kilo baz (kb) uzunluğa kadar DNA bölgeleri çoğaltılabilmektedir, ancak bazı metotlarla bu uzunluk 40 kb'a kadar ulaşabilmektedir.

PCR dört ana fazdan oluşur (Şekil 2.2):

- Lineer Faz: Bu PCR'ın başlangıç aşamasıdır ve yaklaşık 10-15 döngü sürer. Bu bölümde her ne kadar reaksiyon çok hızlı bir şekilde ilerlese de, çoğalma miktarı tespit sınırlarının altında olduğundan herhangi bir artış gözlenmez.
- Erken Üssel Faz: Bu bölüm artış miktarının tespit sınırları içine girdiği bölümdür. Artış miktarı belirli bir eşik seviyeye ulaşır. Bu seviye ulaşılan döngüye C_t (Threshold Cycle-Eşik Döngü) (ABI Prism® literature - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) veya CP (Crossing Point-Kesişme Noktası) (LightCycler® literature - Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) denir (Wong ve Medrano 2005). Bu değer reaksiyona eklenen kalıp kopya sayısının hesaplanmasında kullanıldığı için önemlidir (Wong ve Medrano 2005).
- Üssel Faz: Bu bölümde reaksiyon içindeki DNA miktarı hızla artar.
- Plato Fazı: Bu bölümde, üssel bölümdeki artış miktarı azalır ve reaksiyon durmaya noktasına yaklaşır (Wong ve Medrano 2005). Bunun sebebi reaksiyon reaktiflerin azalması ve daha da önemlisi artan kalıp yoğunluğu

sonucunda primer-kalıp bağlanması yerine kalıp-kalıp bağlanmasının artmasıdır (Syvänen vd 1988).



Şekil 2.2 PCR'in fazları (Wong ve Medrano 2005).

Primerlerin dimer veya saç tokası oluşturması veya kalıp DNA üzerinde çoğalma yapılacak yere özel olmaması PCR'in verimliliğini düşürebileceği için, tasarım aşamasında dikkatli olunması gerekmektedir (Chou vd 1992; Bustin 2002). Bu tip yanlış bağlanma oranlarını azaltmak için, ısıl aktivasyon gerektiren, ısı-stabil polimeraz enzimler üretilmektedir (Bustin 2002).

2.2.1 Yarı-Kantitatif PCR

PCR metodu geliştirildikten kısa bir süre içinde bu metodun nicel olarak kullanımının potansiyeli görülmüştür. Bu metot sayesinde teorik olarak, diğer teknolojilerin tespit sınırlarının çok altındaki miktarlarda DNA'nın miktarının belirlenebilmesinin mümkün olduğu düşünülmüştür. Ancak PCR'da DNA'nın logaritmik olarak artmasını tüm reaksiyon boyunca gerçekleştirmez, reaksiyon yavaşladığı bir plato fazına ulaşır. Bu sebeple reaksiyon

sonunda çoğalan DNA miktarı, göreceli olarak reaksiyona koyulan kalıp DNA hakkında fikir verse de, hassas bir ölçüme izin vermemektedir (Sylvänen vd 1988; Lo 1998).

Bu hassasiyet problemini aşmak için yapılan çalışmalardan 1988 yılında Sylvänen ve ark., her 5 döngüde bir DNA miktarını ölçerek, klasik PCR'ın tek başına nicel bir metot olmadığı, ancak dikkatli çalışıldığı taktirde yarı nicel bir metot olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (Sylvänen vd 1988).

Nicel PCR'ın ilk örneklerinden olan yarıştırmalı PCR çalışmaları ilk olarak 1989-1990 yıllarında arasında yapılmaya başlanmıştır. Yarıştırmalı PCR'da, yoğunluğu bilinen ve içerisine DNA restriksiyon enzim kesim noktası yerleştirilmiş RNA veya DNA'nın seri dilüsyonları, bilinmeyen örnek içine eklenir. PCR reaksiyonu gerçekleşirken hem bilinmeyen kalıp, hem de içerisinde restriksiyon enzimi kesim noktası içeren kalıp çoğalacağından, PCR sonucunda ortaya çıkan ürünün, restriksiyon enzimi ile kesimi sonunda, bilinmeyen örneklerde hassas miktar tayininin mümkün olduğu gösterilmiştir (Becker-André ve Hahlbrock 1989; Wang vd 1989; Gilliland vd 1990; Freeman vd 1999). Ancak bu metot da mükemmel değildir, çalışabilmesi bazı koşullara bağlıdır (Freeman vd 1999).

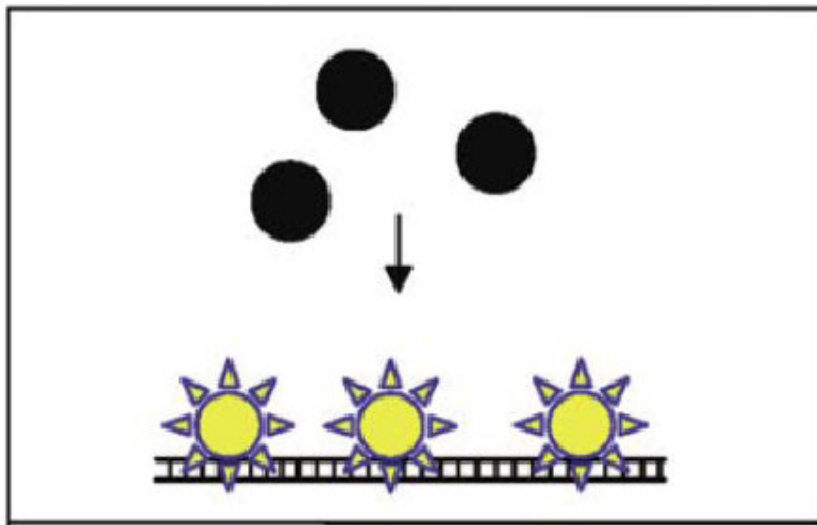
2.2.2 Eş zamanlı PCR

Higuchi ve ark. 1992 ve 1993 yılında yapmış olduğu çalışmalarda, çift zincir floresan DNA boyası ve video kamera kullanarak, PCR'ı eş zamanlı olarak görüntülediklerini bildirdiler. Böylece örnekleri nicel PCR'da olduğu gibi başka bir DNA ile karıştırmadan, DNA'nın hassas ve büyük dinamik bir aralıkta miktar tayininin mümkün olduğunu gösterdiler (Higuchi vd 1992; Higuchi vd 1993).

2.2.2.1 Eş zamanlı PCR Tespit Yaklaşımları

2.2.2.1.1 Çift Zincir DNA Boyaları

Çift zincir DNA'ya bağlandıkları zaman floresan özellik kazanan boyalardır (Şekil 2.3). Ortamda ne kadar çok çift zincir DNA varsa, o kadar fazla ışık yayarlar. Bu sebeple eş zamanlı PCR'da, her döngüde yeni sentezlenen ampliconlar ile birlikte toplam çift zincir DNA miktarı artacağı için, bu boyalar kullanıldığı zaman her döngüde alınan floresan ışık miktarı artar. PCR için kullanılan primerler tek zincir olduğu için, teorik olarak primer kaynaklı bir ışımaya gözlemlenmez (van der Velden vd 2003; Wong ve Medrano 2005). Ancak primerlerin birbirlerine bağlanarak dimer oluşturması sonucunda bir geri plan ışınması oluşabilir. Yüksek geri plan ışınması hassasiyeti düşüreceğinden, primerlerin tasarımında buna dikkat edilmelidir. Bu boyalar diziye özgü olmadığı için, her uygulamada aynı boyayı kullanma gibi bir avantajı vardır. Ancak bu diziye özgü olmama durumundan dolayı, çokluluğa (multiplex) izin vermez ve özgün olmayan sinyal sebebiyle yanlış pozitiflik görülmesine daha yatkındır (Wang vd 1989; Wong ve Medrano 2005). Bu boyaların genelde hassasiyeti daha düşük olmasına rağmen, yeni üretilen yüksek hassasiyetli boyalar ile bu dezavantajı giderilmiştir. Bu boyaları ve DNA'nın artan sıcaklık ile çift zincir yapısının bozularak tek zincire dönüşmesini inceleyen erime eğrisi analizini kullanarak, hassas çalışmalar yapılabilmektedir.



Şekil 2.3 Çift zincir DNA boyaları (Wong ve Medrano 2005). Boyalar solüsyon ortamında iken ışık yaymazken, çift zincir DNA'ya bağlandıklarında floresan özellik kazanırlar

2.2.2.1.2 TaqMan (Hidroliz) Problemleri

Hidroliz problemleri, PCR'in gerekleŒeceđi kalıp üzerinde, primerlerin arasındaki bir bölgeye tümleyici olan, bir ucunda raportör (reporter), diğer ucunda baskılayıcı (quencher) olan tek zincir DNA molekülüdür. Molekül sağlam halde iken baskılayıcı, raportrden gelen ıŒıđı emdiği için, floresan bir ıŒıma gerekleŒmez. Ancak PCR sırasında Taq polimerazın 5'->3' hidroliz özelliğinden dolayı, prob hidrolize olur ve raportör ve baskılayıcı birbirinden ayrılır. Bu ayrılma sonucunda baskılayıcı, raportörün yaydığı ıŒıđı artık ememez ve solüsyon floresan özellik kazanır (Œekil 2.4). PCR sırasında her döngüde daha fazla prob, üssel olarak artan amplicon sayısına göre logaritmik olarak hidrolize olacağından, döngü sayısı arttıka floresan ıŒıma buna bağlı olarak artar (van der Velden vd 2003; Wong ve Medrano 2005). Hidroliz problemleri pahalı olmamak ile birlikte, dŒk geri plan sinyaline ve daha geniŒ dinamik aralığa sahiptirler (Wong ve Medrano 2005; Walker 2006).

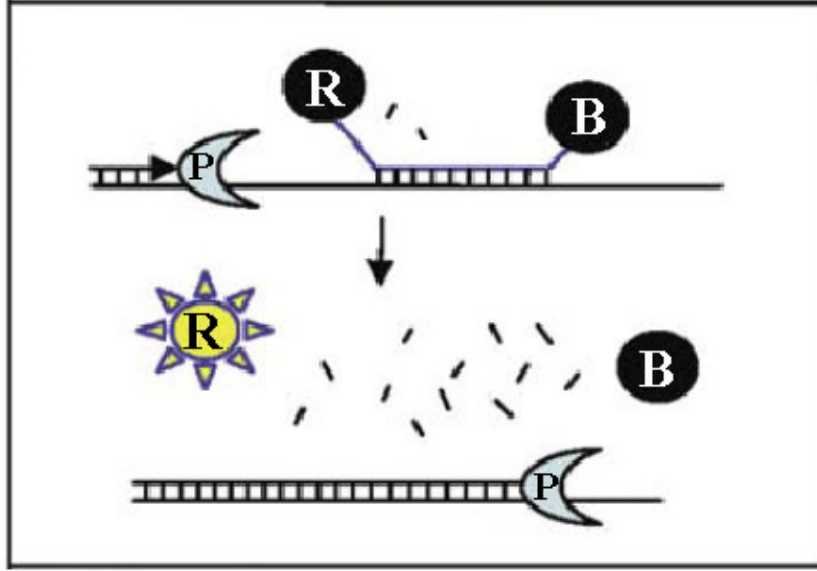
Hidroliz problemleri için kullanılan primerlerin tasarımımda dikkat edilmesi gereken hususlar (Anonim 2008c).

- Primerler 20-24 baz uzunluğunda olmalı
- Kısa ampliconlar en iyi sonucu verir, bu yüzden amplicon uzunluğu 300 baz çiftini geçmemeli.
- GC yüzdesi 20-80 arasında olmalı (% 40-60 daha iyi).
- Aynı nükleotidin uzun tekrarlarından kaçınılmalı (zellikle guaninin tekrarlarından kaçınılmalı).
- Erime sıcaklığı 55-60 °C olmalı.
- İleri ve Ters primerler probun üzerine gelmemek koŒuluyla mümkün olduğunca proba yakın olmalı.
- Primerler G veya C ile bitmeli ancak 3'ten fazla G-C dizisi olmamalı.

Hidroliz problemlerinin tasarımımda dikkat edilmesi gereken hususlar (Anonim 2008c).

- Problar 20-30 baz çifti uzunluğunda olmalı.
- Aynı nükleotidin uzun tekrarlarından kaçınılmalı (zellikle guaninin tekrarlarından kaçınılmalı).

- Proben 5' ucu Guanin olmamalı; florofora bitişik guanin, degradasyondan sonra bile floresan sinyalin bir miktarını bloke eder.
- Probların erime sıcaklığı 65-67 °C olmalı. Probların erime sıcaklığı primerlerden yaklaşık 10 °C fazla olmalı.
- Polimorfik bölge, probun ortası ile son üçte birlik bölümün ortasında arasında olmalı.

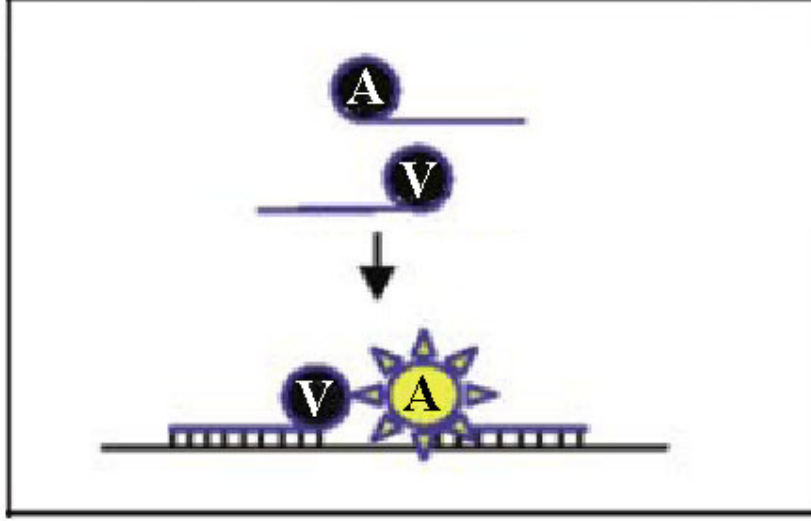


Şekil 2.4 Hidroliz probları (Wong ve Medrano 2005). R: Raportör, B: Baskılayıcı, P: DNA Polimeraz

2.2.2.1.3 Hibridizasyon (Melezleme) Probları

Bu teknikte, biri 3' ucundan verici florokrom ile işaretlenmiş, diğeri ise 5' ucundan alıcı florokrom ile işaretlenmiş iki adet prob DNA vardır. Bu problar, kalıp DNA üzerindeki primerler arasında bir bölgeye, yan yana tümleyici olacak şekilde tasarlanmışlardır. Bu iki prob, solüsyon içindeyken birbirlerine uzak oldukları için floresan özellik göstermezken, aynı ampikon üzerine yan yana bağlandıkları zaman, verici florokromdan yayılan ışığı alıcı florokrom yakalayarak floresan özellik gösterir (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer (Bustin 2002; Wong ve Medrano 2005)) (Şekil 2.5). Floresan özelliğin gösterilebilmesi için alıcı ve verici florokromların 5 nükleotit uzaklıktan daha yakında olmaları yeterlidir. PCR da her döngüde üssel olarak artan ampikonlar üzerine bağlanan

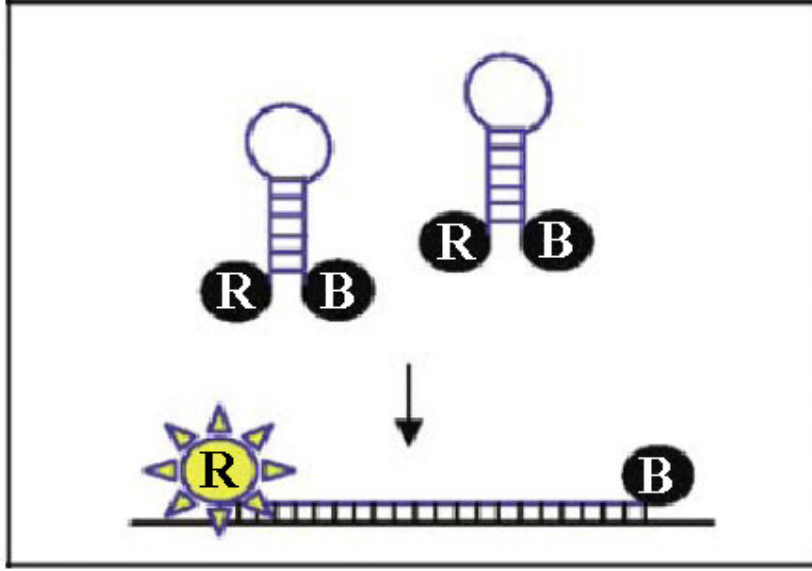
probların sayısı da üssel olarak artacağından, artan amplikon miktarının dolaylı olarak gözlemlenmesi sağlanmış olur (van der Velden vd 2003; Wong ve Medrano 2005; Walker 2006).



Şekil 2.5 Hibridizasyon probları (Wong ve Medrano 2005). A: Alıcı florokrom, V: Verici florokrom

2.2.2.1.4 Moleküler Beacons (Moleküler İşaret/Fener)

Moleküler beacon'lar, orta kısımlarında kalıba eşlenik olan bir bölge, iki ucunda ise birbirini tümleyici iki DNA dizisi ile en basit saç tokası problarıdır (Wong ve Medrano 2005). Raportör ve baskılayıcı ise molekülün iki ucuna eklenmiştir. Molekül solüsyon içinde serbest halde iken saç tokası durumundadır ve baskılayıcının etkisi ile floresan etki görünmez. Ortamda hedef molekül bulunduğu zaman, prob hedefe bağlanır. Bu bağlanma sonucunda saç tokası açılarak, raportör ve baskılayıcı birbirinden ayrılır ve floresan özellik ortaya çıkar (Şekil 2.6). Bu problarda da amplikon miktarı kadar bağlanma olacağından, artan amplikon miktarı ile orantılı olarak floresan özellik te artar (Wong ve Medrano 2005; Walker 2006).



Şekil 2.6 Moleküler beacons (Wong ve Medrano 2005). R: Raportör, B: Baskılayıcı

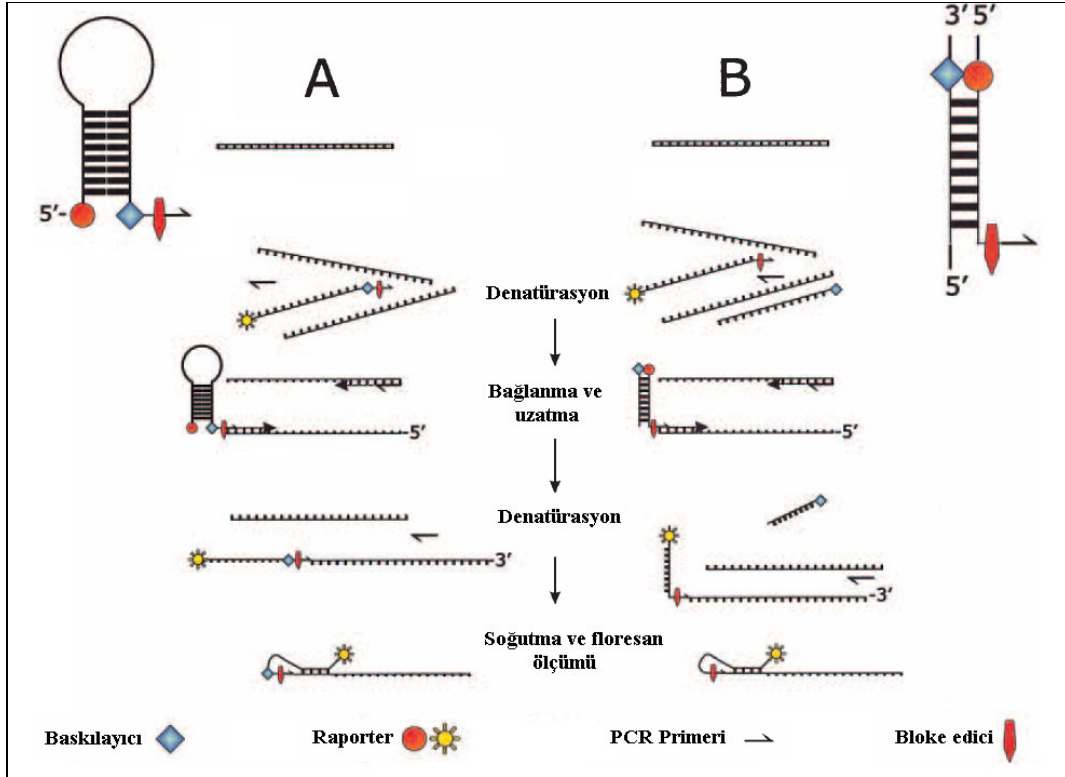
2.2.2.1.5 Scorpions (Akrepler)

Scorpion probları, diziyeye özgü primerizasyon ve bağlanmayı, molekül içi olaya dönüştürmüştür. Orijinal Scorpion tasarısında primere eklenmiş, raportör ve baskılayıcı içeren prob, saç tokası oluşturmuştur ve primere, çoğaltılmayan (bloke edici) bir ara molekül ile bağlanmıştır (hekzetilen glikol gibi). Prob saç tokası durumunda iken raportör ve baskılayıcı birbirine çok yakın olduğu için floresan özellik yoktur. Çoğalma sırasında doğru primerizasyon oluşursa, saç tokası yapısı, yeni oluşan molekülde (amplikonda) daha kararlı olacak başka bir saç tokası yapısına dönüşecek, ve Şekil 2.7-A'da de görülebileceği gibi raportör ile baskılayıcı birbirinden ayrılacağı için floresan özellik kazanılacaktır (Whitcombe vd 1999; Bustin 2002; Wong ve Medrano 2005).

Orijinal Scorpion tasarımında, her ne kadar raportör ile baskılayıcı birbirlerinden ayrılarak florofor floresan özellik kazanmış olsa da, hala aynı molekül içinde ve göreceli olarak birbirlerine yakın oldukları için, az da olsa floresan sinyalde bir düşüş söz konusudur. Bu düşüşü ortadan kaldırmak için Scorpion problemlerine yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir (Şekil 2.7-B). Bu yaklaşıma göre raportör ve baskılayıcı, aynı molekül üzerinde değil, birbirini tümleyici iki ayrı molekül üzerindedir. Doğru primerizasyon gerçekleştiği zaman

floroforun bağlı olduğu kısım, aynı molekül içerisindeki başka bir yere bağlanarak saç tokası durumu tercih edecek, bu da baskılayıcı grubu içeren parçanın molekülden ayrılıp solüsyon içinde uzaklaşarak, daha verimli bir floresan özelliği kazanılmasını sağlayacaktır (Bustin 2002; Wong ve Medrano 2005).

Scorpion problemlerinde de artan ampikon miktarı oranınca floresan sinyal de artış gözlenmektedir (Bustin 2002).



Şekil 2.7 Scorpions (Bustin 2002) A: Orijinal Scorpions tasarımı, B: Yeni Scorpions yaklaşımı

2.3 Sepsiste Koruyucu Önlemler ve Tedavi

2.3.1 Koruyucu Önlemler

Yenidoğanlar hastane enfeksiyonlarına kolay yakalanırlar. Bunun sebebi zayıf bağışıklık sistemi ve yenidoğanlara yapılan girişimsel işlemlerdir. Bu durum, prematürel için daha

da belirgindir. Yenidoğan sepsisinde enfeksiyon kaynağını belirlemek ve buna karşı tedbirler almak çok önemlidir (Vergnano vd 2005). Yenidoğana temastan önce ellerin yıkanması çok önemlidir ve 19. yüzyıldan beri sepsisi önlemede faydası olduğu bilinmektedir ve bu konuda birkaç kılavuz mevcuttur. Personelin de bu konuda sürekli eğitilmesi gerekmektedir.

Girişimsel işlemlerin azaltılmasının hastane enfeksiyonlarını azalttığı gözlemlenmiştir (Vergnano vd 2005). Doğumdan önce doğum kanalının antiseptik ile dezenfeksiyonu ise daha derin araştırılması gereken bir konudur (Vergnano vd 2005).

2.3.2 Tedavi

Yenidoğan sepsisinin tedavisinde destekleyici bakım (Gerdes 2004; Sankar vd 2008), kan değiştirme (Sankar vd 2008) ve immunoterapi (Mathur 1996) gibi yöntemler kullanılsa da, en önemli tedavi yöntemi antibiyotik tedavisidir.

2.3.2.1 Antibiyotik

Tedavide kullanılacak antibiyotik veya antibiyotik karışımı, sepsis ajanına göre belirlenmelidir. Bu sebeple sepsisin tanısı ile beraber, sepsis ajanının da belirlenmesi, tedavi için çok önemlidir. Ancak tedavide gecikme ölüm oranını arttırdığı için, sepsisten şüphelenildiği durumlarda, tanıyı beklemeksizin antibiyotik tedavisine başlamak gerekir. Bu aşamada da sepsis ajanı daha belirlenmemiş olduğu için antibiyotik seçimi muhtemel ajan, toksisite, doku geçirgenliği, maliyet ve bulunabilirlik göz önüne alınarak yapılmalı; sepsis ajanı tam olarak tespit edildiğinde ise verilen antibiyotik veya antibiyotik karışımı tekrar gözden geçirilmelidir (Mathur 1996; Gerdes 2004; Sankar vd 2008). Her durumda kullanılacak evrensel bir antibiyotik karışımı bulunmamakla birlikte, antibiyotik seçimi için kullanılan kapsamlı kılavuzlar mevcuttur (Sankar vd 2008). Batı lkelerinde ilk etapta kullanılabilecek antibiyotik olarak ampisilin ve aminoglikozit karışımı tavsiye edilmektedir

(Mathur 1996). Ancak ampisilin direnci sıklıkla gözlemlenebilen bir olay olduğundan dikkatli olunmalıdır (Mathur 1996).

Antibiyotik direnci global bir sorundur. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinden bildirilen çoklu direnç gösteren bakterilerin sayısı, gün geçtikçe artmaktadır (Mtitimila ve Cooke 2004; Vergnano vd 2005). Birçok ünite de verilen antibiyotik kombinasyonu, bir penisilin türevi ve bir aminoglikozit olan gentamisin içermektedir. Bunun sonucunda birçok gram negatif bakteri, ampisilin ve kloksasiline dirençli hale gelmiş, birçoğu da gentamisine zaman içinde dirençli hale gelmektedir. Bazı ülkelerde *S.aureus* yenidoğan sepsisinde en sık karşılaşılan mikroorganizmadır ve MRSA da yaygındır (Vergnano vd 2005). MRSA için amikasin ile birlikte siprofloksazin veya vankomisin verilmesi önerilmektedir (Sankar vd 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakterilerin Eldesi

Bakteriler Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Yenidoğan Bölümleri'nden, petri kabında agar kültürü olarak temin edilmiştir.

3.1.2 PCR Optimizasyonu ve Eş Zamanlı PCR'ın Denenmesi İçin Materyal

Bakteriler agar üzerinden öze ile kazınarak, 1,5 ml'lik tüpteki 1 ml steril distile suyun içerisine alınmıştır. Homojen hale gelinceye kadar vortekslenmiştir.

3.1.3 Kandan Bakteri Titrasyon Çalışması İçin Materyal

3.1.3.1 Bakteri Yoğunluğunun Tespiti

Bakteriler agar üzerinden öze ile kazınarak, 1,5 ml'lik tüpteki 1 ml steril distile suyun içerisine alınmıştır. Homojen hale gelinceye kadar vortekslenmiştir.

Bakteri yoğunluğu absorbans ölçülerek tespit edilmiştir. 600-620 nm'de 1.0 optik yoğunluk yaklaşık $1,0-0,6 \cdot 10^9$ bakteri/ml'lik bir yoğunluğuna karşılık geldiği belirtilmektedir (Bainer vd 2003; Walker 2006). Bu çalışmada 1.0 optik yoğunluk $0,8 \cdot 10^9$ bakteri/ml olarak kabul edilmiştir. Optik yoğunluk, NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometre'de ve cihazın kendi yazılımı olan ND-1000 V3.3.0'ün Cell Cultures modülünde ve 600 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

3.1.3.2 Bakteri Yoğunluk Titrasyonunun Hazırlanması

Yoğunlukları tespit edilen bakteri süspansiyonları, 10^8 bakteri/ml olacak şekilde, Çizelge 3.1'e göre standardize edilmiştir. Daha sonra bu örnekten 10'ar kat seri seyreltmeler yapılarak 10^7 , 10^6 , 10^5 ve 10^4 bakteri/ml süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu işlem üç bakteri türü için de yapılmıştır.

Çizelge 3.1 10^8 bakteri / ml yoğunluktaki standart süspansiyonların hazırlanması

Bakteri	Optik Yoğunluk	Bakteri Yoğunluğu (10^8 bakteri / ml)	Alınan Hacim (μ l)	Eklenen Distile Su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	Son Yoğunluk (10^8 bakteri / ml)
<i>E.coli</i>	0,64	5,12	50	206	256	1
<i>E.faecium</i>	0,78	6,24	50	262	312	1
<i>S.aureus</i>	0,84	6,72	50	286	336	1

3.1.3.3 Titrasyon Örneklerinin Hazırlanması

Örnekler Çizelge 3.2'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Kan olarak EDTA'lı tüpe alınmış periferik tam insan kanı kullanılmıştır. Gerekli etik kurul kararı, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden alınmıştır.

Çizelge 3.2 Bakteri yoğunluk titrasyonu için örneklerin hazırlanması

Örnek No.	Kan Miktarı (μ l)	Bakteri Yoğunluğu (bakteri / ml)	Eklenen Bakteri Miktarı (μ l)	Bakteri / 100 μ l kan (adet)
1	100	0	10	0
2	100	10^4	10	10^2
3	100	10^5	10	10^3
4	100	10^6	10	10^4
5	100	10^7	10	10^5
6	100	10^8	10	10^6

3.2 Yöntem

Bu tez, TÜBİTAK 1507 ArGe Başlangıç Destek Programı, 7070521 nolu projesinin bir parçası olarak, İntergen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nde yapılmıştır.

3.2.1 DNA İzolasyonu

3.2.1.1 PCR Optimizasyonu ve Eş Zamanlı PCR'ın Denenmesi İçin DNA İzolasyonu

1 ml steril distile suyun içerisindeki bakteriler, ısıtıcı blokta (BIOSAN CH-100) 95⁰C'de 15 dk bekletilmiş, daha sonra 13.000 RPM'de 2 dk. santrifuj edilerek (Eppendorf – Centrifuge 5415R) supernatan alınmış ve sonraki aşamalarda PCR karışımları içerisindeki direkt eklenerek, kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

3.2.1.2 Kan İçinden Titrasyon Çalışması İçin DNA İzolasyonu

Madde 3.1.3'te hazırlanmış örneklerden DNA izolasyonu REALPURE SPIN KIT – REAL kiti (Durviz, S.L.U) ile yapılmıştır. Tam kandan DNA izolasyonu için geliştirilmiş bu kit, bakteri DNA'sını da izole edebilmesi için aşağıdaki şekilde modifiye edilmiştir:

- 1) 1,5 ml'lik tüp içerisine 100 µl tam kan, 100 µl lizozim çözeltisi (10 mg / ml) ve 10 µl bakteri süspansiyonu eklenir.
- 2) 37⁰C'de 30 dk. inkübe edilir.
- 3) 180 µl Tissue Lysis Buffer (REAL-E22) ve 20 µl proteinaz K (20 mg / ml) eklenir.
- 4) 55⁰C'de 30 dk. inkübe edilir.
- 5) 200 µl Lysis / Binding Buffer (REAL-REA01) eklenir.
- 6) 70⁰C'de 10 dk. inkübe edilir.
- 7) 300 µl saf izopropanol (MP Biomedicals - No.:19400690) eklenir.

- 8) Karşım toplama tüpü (REAL-R30) içerisine yerleştirilen kolon (REAL-RSC01) içerisine eklenir.
- 9) 8.000 rpm'de 60 sn. çevrilir (Eppendorf – Centrifuge 5415R).
- 10) Toplama tüpü atılır, kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
- 11) 500 µl Disinhibition Buffer (REAL-REA03) eklenir.
- 12) 8.000 rpm'de 60 sn. çevrilir (Eppendorf – Centrifuge 5415R). Toplama tüpü atık kabına boşaltılır.
- 13) 500 µl Wash Buffer (REAL-REA04) eklenir.
- 14) 8.000 rpm'de 60 sn. çevrilir (Eppendorf – Centrifuge 5415R).Toplama tüpü atık kabına boşaltılır.
- 15) 13. ve 14. basamaklar tekrar edilir.
- 16) En yüksek hızda 90 sn. çevrilir (Eppendorf – Centrifuge 5415R). Toplama tüpü atılarak kolon 1,5 ml'lik steril tüpe yerleştirilir.
- 17) 70⁰C'ye ısıtılmış 10 µl Elution Buffer (REAL-REA05) kolona eklenir. 70⁰C'de 60 sn. inkübe edilir.
- 18) En yüksek hızda 90 sn. çevrilir (Eppendorf – Centrifuge 5415R).
- 19) 17. ve 18. basamaklar iki defa tekrar edilir.
- 20) Kolon atılır. 1,5 ml'lik tüpte izole edilen DNA vardır.

3.2.2 Eş zamanlı PCR

3.2.2.1 16S rRNA Geni Dizilerinin Eldesi

3 tür için de 16S rRNA geni dizileri, online veri tabanı olan “Ribosomal Database Project”ten alınmıştır (internet adresi: http://rdp.cme.msu.edu/hierarchy/hb_intro.jsp).

3.2.2.1.1 *Escherichia coli*

>S000711522 *Escherichia coli* 536; CP000247 (Dizinin tamamı EK 1'dedir).

3.2.2.1.2 *Enterococcus faecalis*

>S000001976 *Enterococcus faecalis*; LMG 7937; AJ301831 (Dizinin tamamı EK 2’dedir).

3.2.2.1.3 *Staphylococcus aureus*

>S000000257 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (T); ATCC 12600; X68417 (Dizinin tamamı EK 3’tedir).

3.2.2.2 Korunmuş/Korunmamış Bölgelerin Tespiti

Korunmuş/Korunmamış bölgelerin tespiti için online bir hizalama programı olan “MultAlin” kullanılmıştır (Corpet 1988) (internet adresi: <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). Hizalama sonuçları EK 4’tedir.

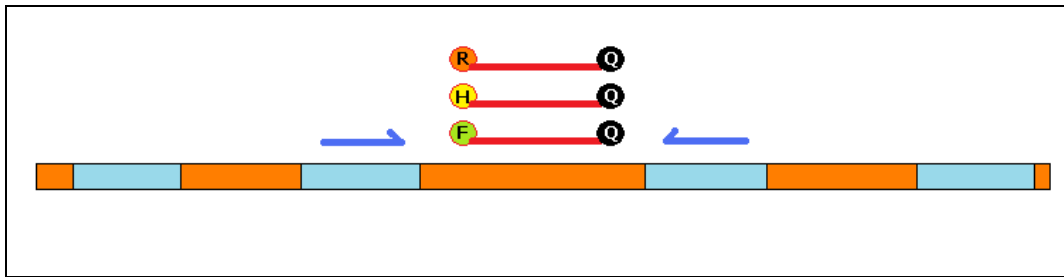
3.2.2.2.1 Tür İçi Heterojenitenin Kontrolü

Tür içerisinde bulunabilecek yüksek frekanslı bir varyasyon olasılığına karşı, “Ribosomal Database Project”ten (internet adresi: http://rdp.cme.msu.edu/hierarchy/hb_intro.jsp) rastgele alınan aynı türe ait 10 – 12 16s rRNA dizisinin primerler ile çoğaltılacak bölgeleri, her bir bakteri için ayrı olacak şekilde “MultAlin” kullanılarak hizalanmıştır (Corpet 1988) (internet adresi: <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>).

3.2.2.3 Tasarım

Eş zamanlı PCR tasarımı, türler için ortak primer çifti ve türe özgü eş zamanlı PCR problemleri şeklinde yapılmıştır (Şekil 3.1). Eş zamanlı PCR için TaqMan (Hidroliz) problemleri kullanılmıştır. Üç tür için de farklı absorpsiyon ve emisyon dalga boylarına sahip raportörler kullanılmıştır.

Problemler Gunderson ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada (Gunderson vd 2004) kullandıkları kod çözme (decoding) yöntemine uygun bir şekilde tasarlanmıştır. Bu sayede metoda esneklik ve pratiklik kazandırılmıştır.



Şekil 3.1 Eş zamanlı PCR tasarımı: Kalıp DNA üzerindeki korunmuş bölgeler üzerinden (açık mavi) primerler (koyu mavi oklar), primerlerin arasındaki korunmamış bölge üzerinden (turuncu) hidroliz problemleri tasarlanmıştır

3.2.2.3.1 Primerler

Primer dizaynı için korunmuş bölgeler olan 786-843 (Ek 7.2) ve 940-1008 (Ek 7.2) arasında primerler seçilmiştir. Primer tasarımında “PRIMER[®] – Primer Designer v.2.0 (Scientific & Educational Software)” yazılımı kullanılmıştır. Primerler Metabion International AG’ye sentezletilmiştir. Primer dizileri ve tasarım raporu EK 5’tedir.

3.2.2.3.2 Problar

Probların dizaynında online oligo inceleme yazılımı olan, Oligo Analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) kullanılmıştır. TIB MOLBIO Syntheselabor GmbH firmasına sentezletilmiştir. Probların dizi üzerindeki gösterimleri Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'tedir.

3.2.2.3.2.1 *Escherichia coli*

GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGAGGGTTGTGCCCTGA
GGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAT

5'- AGC CAC GCC TCA AGG GCA CAA CCT C -3'

COMPLEMENT:

5'- GAG GTT GTG CCC TTG AGG CGT GGC T -3'

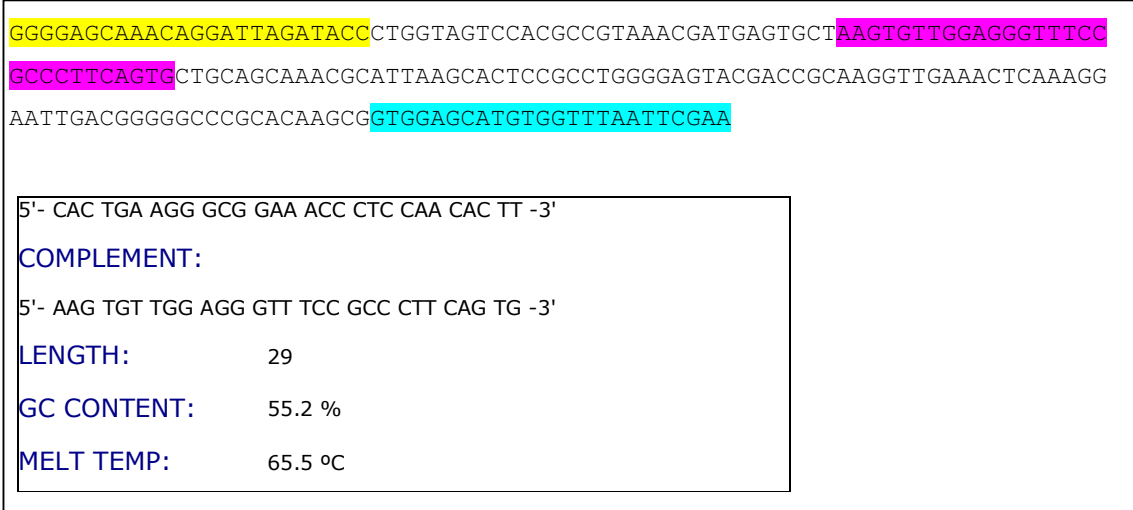
LENGTH: 25

GC CONTENT: 64.0 %

MELT TEMP: 67.3 °C

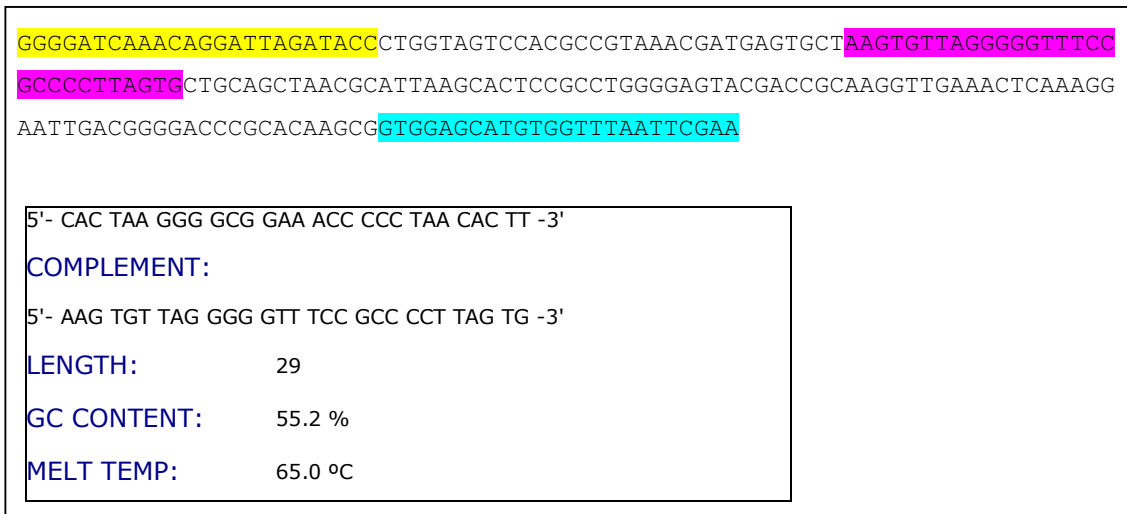
Şekil 3.2 *E. coli* için prob tasarımı ve primerler ile birlikte dizi üzerinde gösterimi; ileri primer sarı renkte, ters primer mavi renkte, prob pembe renkte gösterilmiştir

3.2.2.3.2 *Enterococcus faecalis*



Şekil 3.3 *E. faecalis* için prob tasarımı ve primerler ile birlikte dizi üzerinde gösterimi; ileri primer sarı renkte, ters primer mavi renkte, prob pembe renkte gösterilmiştir

3.2.2.3.3 *Staphylococcus aureus*



Şekil 3.4 *S. aureus* için prob tasarımı ve primerler ile birlikte dizi üzerinde gösterimi; ileri primer sarı renkte, ters primer mavi renkte, prob pembe renkte gösterilmiştir

3.2.2.3.2.4 Raportör ve Baskılayıcılar

Türlere özel tasarlanan proplar için Çizelge 'de gösterilen raportör ve baskılayıcılar kullanılmıştır. Kullanılan raportörün deteksiyonun hangi kanaldan yapıldığı yine Çizelge 3.3'tedir.

Çizelge 3.3 Proplar için kullanılan raportör, baskılayıcı ve raportörün kanalı

	5' Raportör	Renk / Kanal	Prob Dizisi	3' Baskılayıcı
<i>E. coli</i>	ROX™	Turuncu	5'- AGC CAC GCC TCA AGG GCA CAA CCT C -3'	BHQ-2™
<i>E. faecalis</i>	FAM™	Yeşil	5'- CAC TGA AGG GCG GAA ACC CTC CAA CAC TT -3'	BHQ-1™
<i>S. aureus</i>	HEX™	Sarı	5'- CAC TAA GGG GCG GAA ACC CCC TAA CAC TT -3'	BHQ-1™

3.2.2.4 Reaksiyon Koşulları

3.2.2.4.1 PCR Optimizasyonu

PCR koşullarının optimizasyonu için primerler 55-65⁰C sıcaklıkta denenmiştir. Bu amaç için, Bölüm 3.2.1.1'de tarif edildiği gibi hazırlanan *S. aureus* DNA'sı kullanılmıştır. Primerler Çizelge 3.4'teki reaksiyon koşullarında ve Çizelge 3.5'teki termal döndürücü koşullarında, gradient termal döngü cihazı olan Biorad MJ Mini™ cihazı kullanılarak denenmiştir.

Çizelge 3.4 PCR optimizasyonu reaksiyon koşulları

Reaktif	Miktar (µl)
Steril Distile Su (Eczacıbaşı-Baxter)	16,3
10x Tampon (Qiagen – 203203)	2,5
MgCl ₂ (Qiagen – 203203) (25 mM)	1,5
Primer İleri (5µM)	1
Primer Ters (5µM)	1
dNTP Karışımı (her biri için 10 mM)	0,5
Taq DNA Polimeraz (5 ünite / µl) (HotStartTaq® / Qiagen – 203203)	0,2
DNA	2
Toplam Hacim	25

Çizelge 3.5 PCR optimizasyonu termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Döngü Sayısı
95	12:00	1
95	00:45	35
55 – 65	1:00	
72	00:45	
72	10:00	1
4	Süresiz	1

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürün, % 0,1 Ethidyum Brömür içeren % 2'lik agaroz jelde 120 voltta 15 dk. yürütüldükten sonra jel, UV transilluminatörde (KODAK – Gel Logic 200 Imaging Systems) görüntülenerek fotoğrafı alınmıştır.

3.2.2.4.2 PCR Optimizasyonunun Doğrulanması

PCR optimizasyonunda tespit edilen koşulların, üç bakteri türü için de geçerli olduğu aynı zamanda insan genomik DNA'sı için negatif olduğunun doğrulanması amacı ile 3 bakteri ve insan genomik DNA'sı Çizelge 'deki reaksiyon koşulları ve Çizelge 3.6'daki termal döngü koşullarında denenmiştir.

Çizelge 3.6 PCR optimizasyonunun doğrulanması için termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Döngü Sayısı
95	12:00	1
95	00:45	35
60	1:00	
72	00:45	
72	10:00	1
4	Süresiz	1

3.2.2.4.3 Eş Zamanlı PCR'in Denenmesi

Probların çalışıp çalışmadıklarının denenmesi için PCR optimizasyonu ve eş zamanlı PCR'in denenmesi için izole edilen DNA'lar (Bölüm 3.2.1.1) kullanılarak deneme çalışması yapılmıştır. Üç bakteri için tasarlanan problar ayrı ayrı ve üçünün birlikte bulunduğu bir reaksiyon olacak şekilde dört farklı reaksiyon karışımı Çizelge 3.7'deki gibi hazırlanmıştır.

Eş zamanlı PCR cihazı olarak Corbett Research Rotor-gene™ 6000 Model:5-plex kullanılmış ve ayarları aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- Rotor tipi: 36-kuyucuklu rotor
- Reaksiyon hacmi: 25 µl
- Aquiring (Veri Toplama): Green, Orange, Yellow (Yeşil, Turuncu, Sarı)
- Auto-Gain Optimisation (Kendi kendine kazanım optimizasyonu): Perform optimisation before 1st acquisition (Birinci verici alımından önce optimizasyon gerçekleştirir)

Eş zamanlı PCR cihazının kanal ayarları Çizelge 3.8'deki gibi yapılmıştır.

Eş zamanlı PCR cihazının termal döngü ayarları Çizelge 3.9'deki gibi yapılmıştır.

Çizelge 3.7 Eş zamanlı PCR'in denemesi için reaksiyon koşulları

Reaktif	Miktar (µl)			
	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2	Reaksiyon 3	Reaksiyon 4
Çift Distile Su	15,3	15,3	15,3	13,3
10x Tampon	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5	1,5	1,5
Primer İleri (5µM)	1	1	1	1
Primer Ters (5µM)	1	1	1	1
dNTP Karışımı (her biri için 10 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5
Prob (<i>E. coli</i>) (5µM)	1	-	-	1
Prob (<i>E. faecalis</i>) (5µM)	-	1	-	1
Prob (<i>S. aureus</i>) (5µM)	-	-	1	1
Taq DNA Polimeraz (5 ünite / µl)	0,2	0,2	0,2	0,2
DNA	2	2	2	2
Toplam Hacim	25	25	25	25

Çizelge 3.8 Eş zamanlı PCR cihazının kanal ayarları

Adı	Tüp Pozisyonu	Asgari Okuma	Azami Okuma	Asgari Kazanım	Azami Kazanım
Green	1	5Fl	10Fl	-10	10
Yellow	1	5Fl	10Fl	-10	10
Orange	1	5Fl	10Fl	-10	10

Çizelge 3.9 Eş zamanlı PCR cihazının termal döngü ayarları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Döngü Sayısı
95	10:00	1
95	00:20	50
60	00:45	
72	00:15	

3.2.2.4.4 Kan İçinden Titrasyon alışması

Eş zamanlı PCR'ın denenmesinde reaksiyon koşulları olarak izelge 3.7'deki Reaksiyon 4 koşulları kullanılmıştır. Eş zamanlı PCR cihazı ayarları ve termal döngü ayarları için de Bölüm 3.2.2.4.3'te kullanılan ayarların aynısı uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Bakteri Yoğunluğu Ölçümü Sonuçları

Spektrofotometrik ölçüm sonuçları Çizelge 4.1'deki gibidir.

Çizelge 4.1 Spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Sample ID	User ID	Date	Time	Baseline	600 nm Abs.	Measure type	Serial#
	Default	01.11.2008	10:55	0	0	Blank	USB2G25492BA368
<i>S.aureus</i>	Default	01.11.2008	10:58	0	0,084	Measure	USB2G25492BA368
	Default	24.11.2008	20:01	0	0	Blank	USB2G25492BA368
<i>E.coli</i>	Default	24.11.2008	20:07	0	0,064	Measure	USB2G25492BA368
	Default	25.11.2008	19:40	0	0	Blank	USB2G25492BA368
<i>E.faecium</i>	Default	25.11.2008	19:46	0	0,078	Measure	USB2G25492BA368

Kullanılan cihaz, 1 mm'den ölçüm yaptığından optik yoğunluğu bulmak için spektrofotometrik ölçümlerin cm'ye dönüştürülmesi gerekmektedir (Anonim 2006). Bu sebeple ölçülen değerler 10 ile çarpılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Bakteri süspansiyonlarının 600 nm'deki optik yoğunlukları

	600 nm'deki Optik Yoğunluk
<i>E.coli</i>	0,64
<i>E.faecium</i>	0,78
<i>S.aureus</i>	0,84

4.2 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları

Türler içinde, problemlerin bağlandığı 55. ve 85. nükleotidler arasındaki bölgelerde herhangi bir heterojeniteye rastlanmamıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

	1				50
S000000986	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000005491	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000004313	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000711522	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000711527	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000653076	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000653074	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000653072	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000711530	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000860490	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S001014511	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
S000860495	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
Consensus	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGT
	51				100
S000000986	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGANN	TAACGCGTTA
S000005491	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGANN	TAACGCGTTA
S000004313	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGANN	TAACGCGTTA
S000711522	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S000711527	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S000653076	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S000653074	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S000653072	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S000711530	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S000860490	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S001014511	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
S000860495	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGC	TAACGCGTTA
Consensus	CGACTTGAG	GTTGTGCCCT	TGAGGCGTGG	CTTCCGAGc	TAACGCGTTA
	101				150
S000000986	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000005491	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000004313	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000711522	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000711527	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000653076	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000653074	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000653072	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000711530	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000860490	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S001014511	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
S000860495	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
Consensus	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG
	151				193
S000000986	ACGGGGGCC-	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000005491	ACGGGGGCC-	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000004313	ACGGGGGCC-	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000711522	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000711527	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000653076	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000653074	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000653072	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000711530	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000860490	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S001014511	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
S000860495	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT
Consensus	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAT

Şekil 4.1 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları – *E. coli*

	1				50
S000001976	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000012997	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000127028	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000375664	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000319413	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000261697	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000134137	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000013428	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000427506	GGGGA	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
S000008133	GKSAT	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
Consensus	Gggga	GCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG TAAACGATGA
	51				100
S000001976	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000012997	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000127028	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000375664	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000319413	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000261697	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000134137	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000013428	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000427506	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
S000008133	GCGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CAAACGCATT
Consensus	GtGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CaAACGCATT
	101				150
S000001976	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000012997	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000127028	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000375664	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000319413	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000261697	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000134137	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000013428	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000427506	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000008133	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
Consensus	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
	151				194
S000001976	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000012997	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000127028	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000375664	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000319413	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000261697	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000134137	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000013428	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	-TGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000427506	GACGGGGGCC	CG-ACAAGCG	GTGGAGCATG	TG-TTTAATT	CGAA
S000008133	GACGGGGGCC	-GCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
Consensus	GACGGGGGCC	cGcACAAGCG	GTGGAGCATG	TGgTTTAATT	CGAA

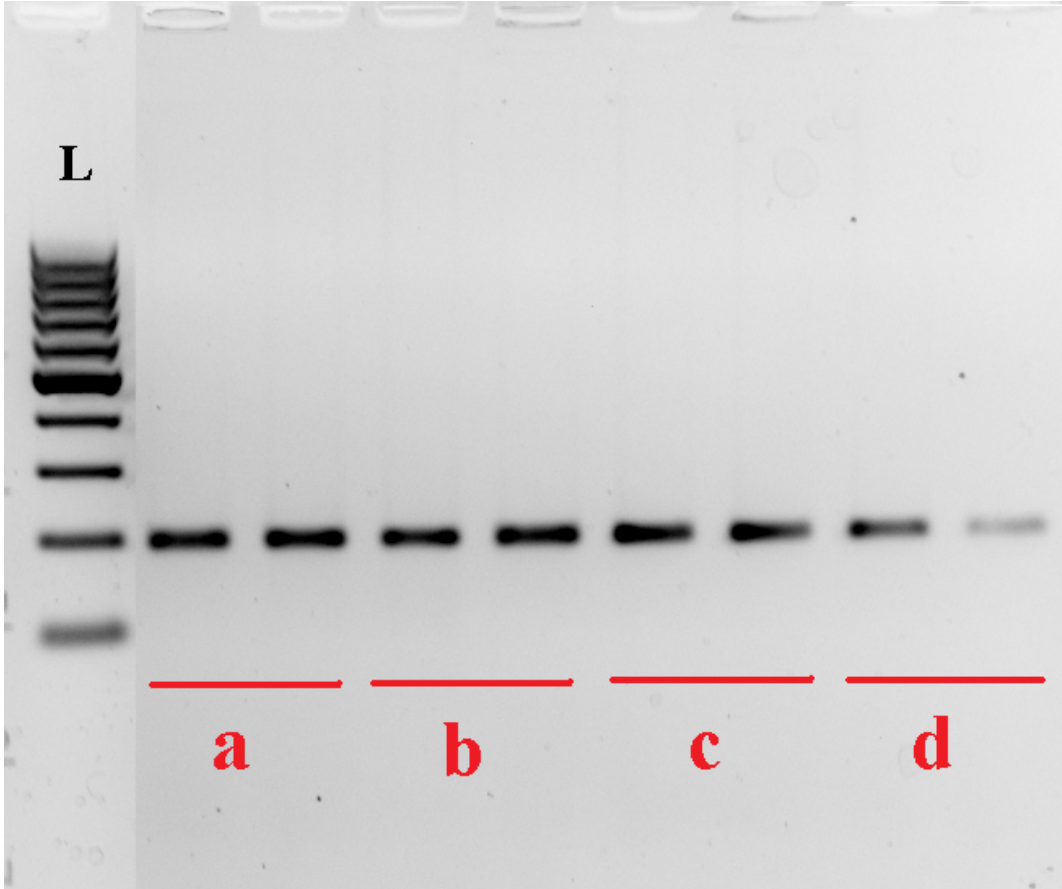
Şekil 4.2 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları – *E. faecalis*

	1				50
S000000257	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000387145	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000528565	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000528551	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000414711	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000413958	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000413957	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000413956	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000413955	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000413954	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
S000388132	GGGAATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
Consensus	GGGGATCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA
	51				100
S000000257	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000387145	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000528565	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000528551	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000414711	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000413958	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000413957	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000413956	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000413955	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000413954	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
S000388132	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
Consensus	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
	101				150
S000000257	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000387145	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000528565	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000528551	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000414711	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000413958	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000413957	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000413956	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000413955	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000413954	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
S000388132	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
Consensus	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
	151				194
S000000257	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000387145	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000528565	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000528551	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000414711	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000413958	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000413957	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000413956	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000413955	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000413954	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
S000388132	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA
Consensus	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAA

Şekil 4.3 Tür İçi Heterojenite Kontrolü Sonuçları – *S. aureus*

4.3 PCR Optimizasyonu Sonuçları

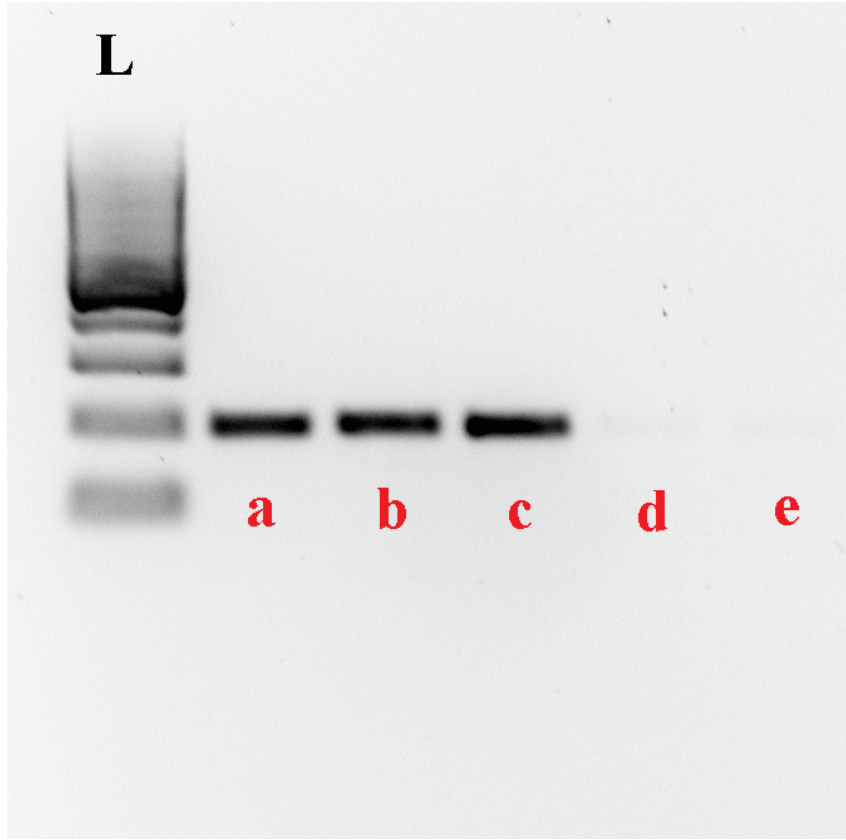
Yapılan gradient PCR'in sonucunda belirtilen koşullarda ve bağlanma sıcaklığı olarak 55-62 °C arasında, *S.aureus* için primerlerin iyi çalıştığı tespit edilmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.4'tedir.



Şekil 4.4 PCR optimizasyonu jel görüntüsü: a: 55°C, b: 58°C, c: 62°C, d: 65°C, L: 100 bp DNA boy belirteci. DNA boy belirteci ile örnekler arasında çalışma dışı örnekler bulunduğundan, bu örnekler görüntüden çıkartılmıştır. Jel görüntüsünün aslı EK 6'dadır

4.4 PCR Optimizasyonunun Doğrulanmasının Sonuçları

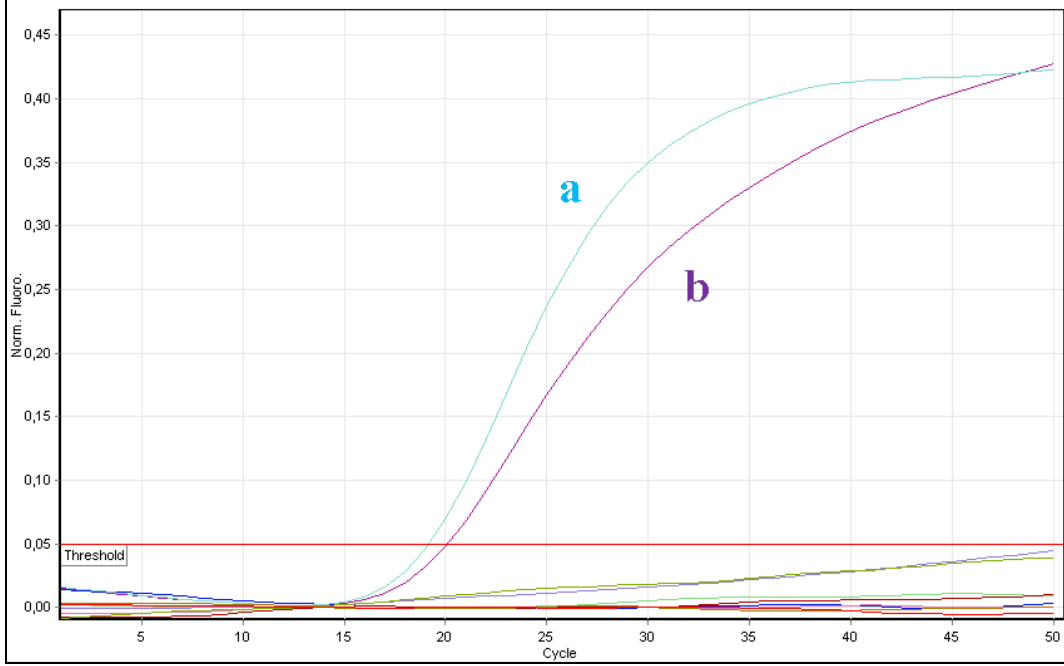
PCR reaksiyonun belirtilen koşullarda üç bakteri için de iyi çalıştığı, insan genomik DNA'sında ve negatif kontrolde ise reaksiyonun çalışmadığı gözlemlenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.5'tedir.



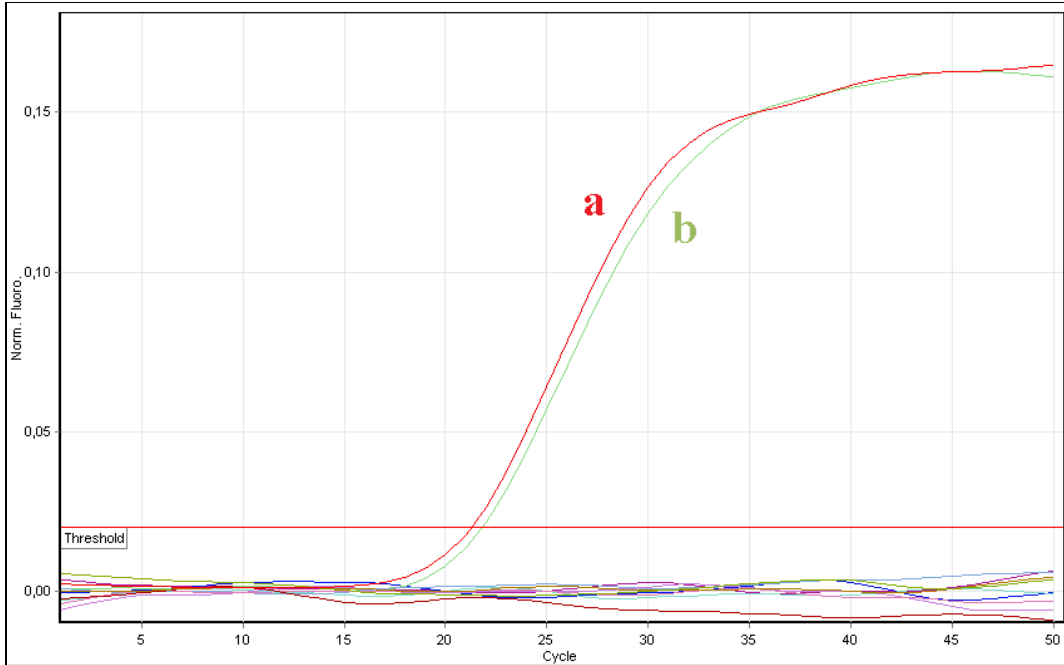
Şekil 4.5 PCR optimizasyonunun doğrulanmasının jel görüntüsü: a: *E. coli*, b: *E. faecalis*, c: *S. aureus*, d: insan genomik DNA, e: negatif kontrol, L: 100 bp DNA boy belirteci

4.5 Eş Zamanlı PCR Denenmesinin Sonuçları

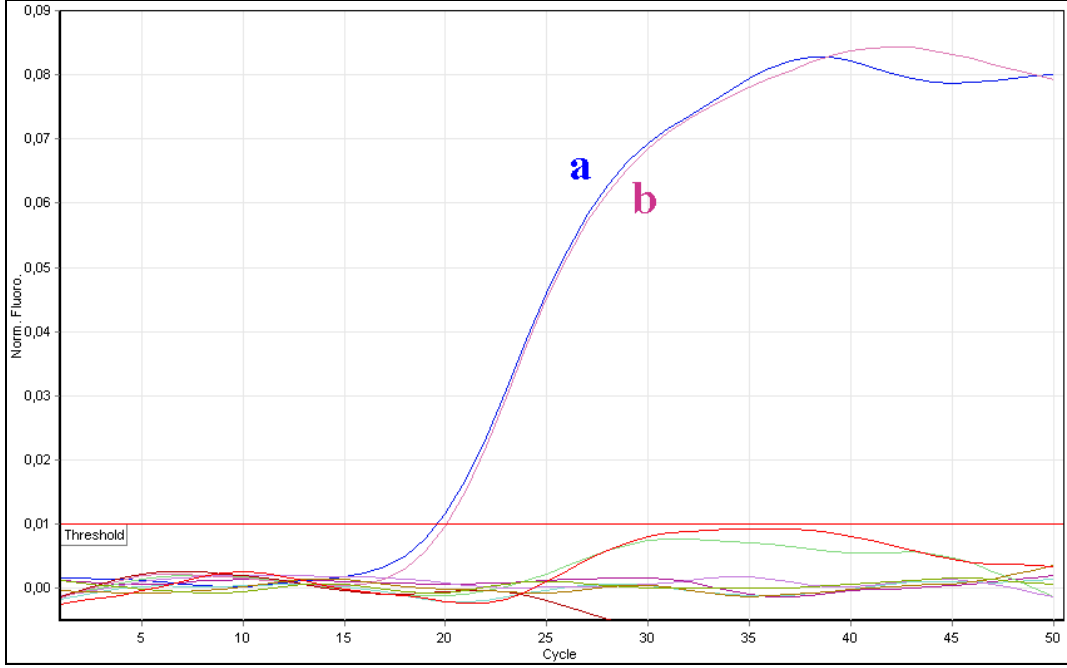
Üç bakteri için de problemlerin özgül olduğu, hem üç bakteri için problemlerin beraber bulunduğu reaksiyonda, hem de problemlerin tek başlarına bulunduğu reaksiyonlarda, özgüllük gözlenmiş, herhangi bir çapraz sinyalizasyon durumu ile karşılaşılmamıştır. Eş zamanlı PCR grafikleri Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'dedir.



Şekil 4.6 Eş zamanlı PCR denemesinin sonuçları – Turuncu kanal: *E. coli*, a: Reaksiyon 1, b: Reaksiyon 4



Şekil 4.7 Eş zamanlı PCR denemesinin sonuçları – Yeşil kanal: *E. faecalis*, a: Reaksiyon 2, b: Reaksiyon 4



Şekil 4.8 Eş zamanlı PCR denenmesinin sonuçları – Sarı kanal: *S. aureus*, a: Reaksiyon 3, b: Reaksiyon 4

4.5.1 C_t Değerleri

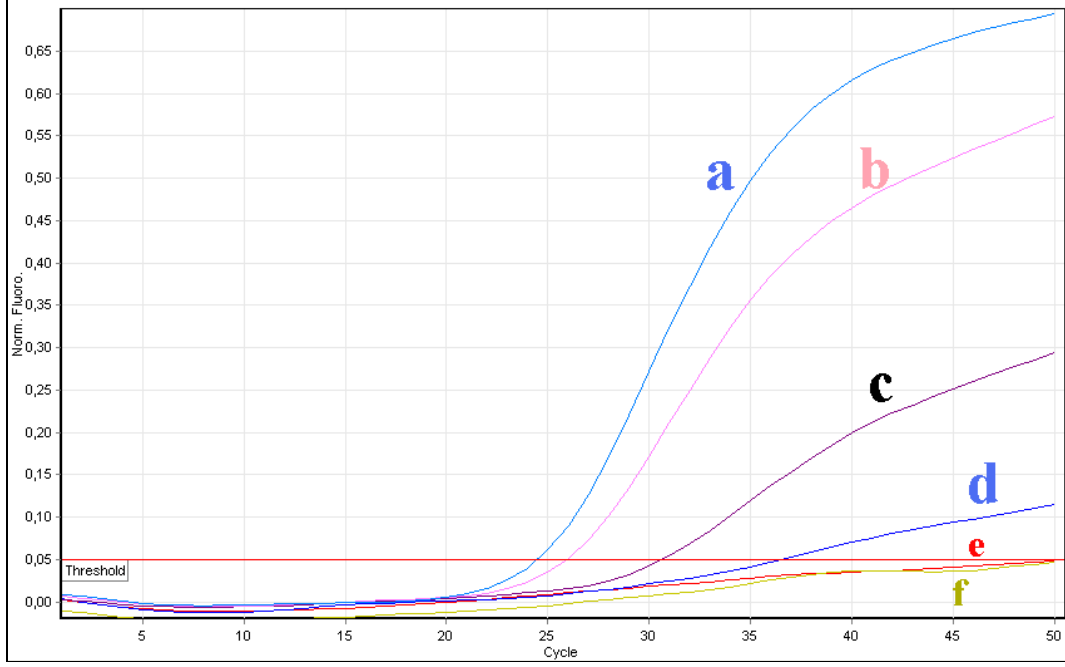
Eş zamanlı PCR denemesinde elde edilen C_t değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Eş zamanlı PCR denemesinde elde edilen C_t değerleri

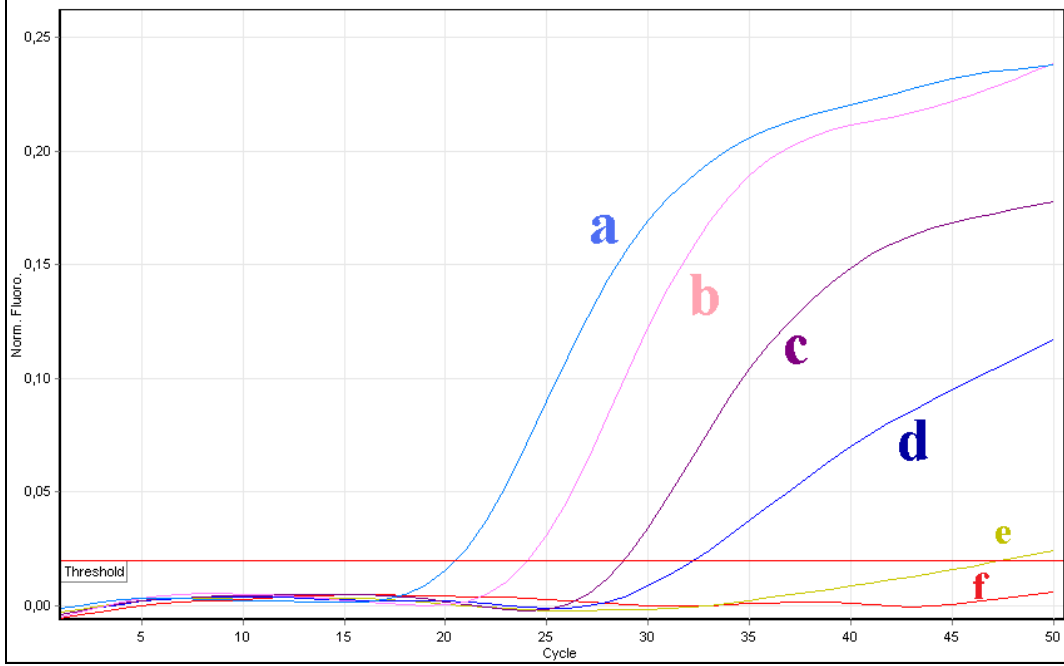
Turuncu Kanal	C _t değerleri (eşik değeri = 0,5)			
	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2	Reaksiyon 3	Reaksiyon 4
<i>E.coli</i>	19,2	-	-	20,1
<i>E.faecalis</i>	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-
Yeşil Kanal	C _t değerleri (eşik değeri = 0,2)			
	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2	Reaksiyon 3	Reaksiyon 4
<i>E.coli</i>	-	-	-	-
<i>E.faecalis</i>	-	21,3	-	21,8
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-
Sarı Kanal	C _t değerleri (eşik değeri = 0,1)			
	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2	Reaksiyon 3	Reaksiyon 4
<i>E.coli</i>	-	-	-	-
<i>E.faecalis</i>	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	20,1	19,6

4.6 Kan İçinden Titrasyon alışmasının Sonuçları

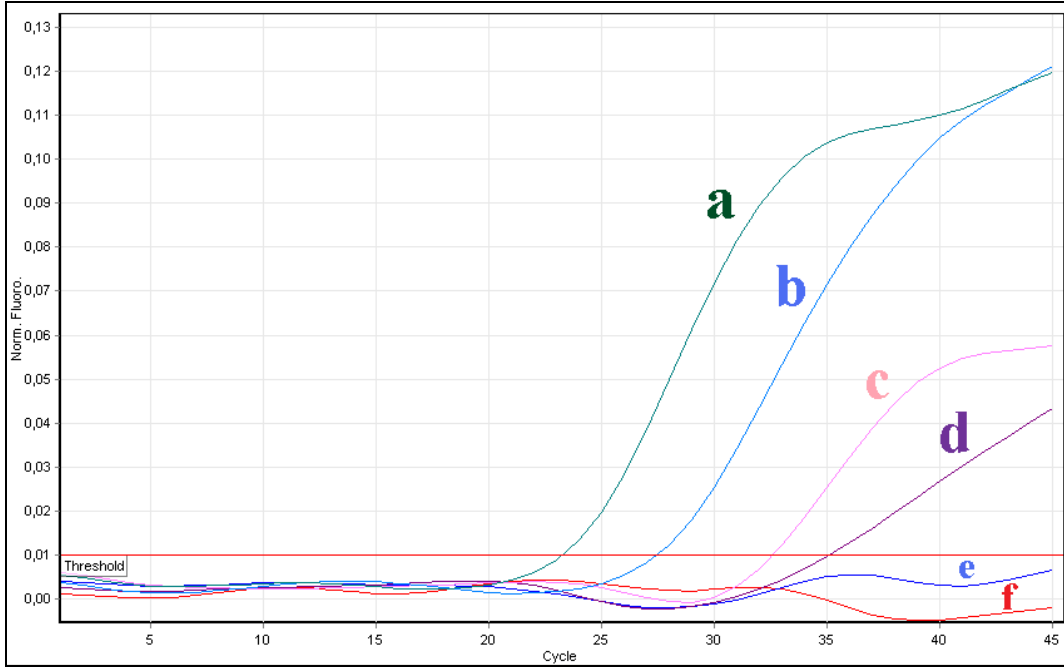
Kan içinden yapılan titrasyon çalışmasının eş zamanlı PCR grafikleri Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'dedir.



Şekil 4.9 Kan içinden titrasyon çalışmasının sonuçları (*E. coli*): a: 10^6 , b: 10^5 , c: 10^4 , d: 10^3 , e: 10^2 , f: 0 bakteri / 100µl kan



Şekil 4.10 Kan içinden titrasyon çalışmasının sonuçları (*E. faecalis*): a: 10^6 , b: 10^5 , c: 10^4 , d: 10^3 , e: 10^2 , f: 0 bakteri / 100µl kan



Şekil 4.11 Kan içinden titrasyon çalışmasının sonuçları (*S. aureus*): a: 10^6 , b: 10^5 , c: 10^4 , d: 10^3 , e: 10^2 , f: 0 bakteri / 100µl kan

4.6.1 C_t Değerleri

Kan içinden yapılan titrasyon çalışmasında elde edilen C_t değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Kan içinden yapılan titrasyon çalışmasında elde edilen C_t değerleri

Örnek No.	Bakteri Yoğunluğu (adet / 100µl kan)	Bakteri Yoğunluğu (adet / reaksiyon)	Kanallar, seçilen eşik değerleri ve bakteriler		
			Turuncu 0,05 <i>E. coli</i>	Yeşil 0,02 <i>E. faecalis</i>	Sarı 0,01 <i>S. aureus</i>
1	0	0	-	-	-
2	10 ²	< 10	-	47,6	-
3	10 ³	< 10 ²	36,6	32,3	35,1
4	10 ⁴	< 10 ³	30,7	28,8	32,6
5	10 ⁵	< 10 ⁴	25,9	24,1	27,5
6	10 ⁶	< 10 ⁵	24,5	20,6	23,3

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada sepsis vakalarında kullanılmak üzere, seçilen 3 bakterinin kan içerisinden tanımlanmasına yönelik bir metot geliştirilmiştir. Yaklaşım olarak eş zamanlı PCR ile hidroliz problemleri kullanılmıştır. Yenidoğan sepsisinin tanısındaki yetersizliklerden dolayı büyük ihtiyacın olduğu bu alanda, ihtiyacı tamamen gidermek mümkün olmasa da, bu amaç için kullanılabilen bir metot geliştirilmiştir.

5.1 Tasarlanan Yarıştırmalı Problemler Ve Özgüllük Performansları

Bu çalışmada tasarlanan problemler yarıştırmalı kullanılmak üzere tasarlanmıştır; yani aynı reaksiyon ortamı içerisinde, kalıp DNA'ya en uygun olanın bağlanması sonucu sinyal verecek şekilde tasarlanmıştır. Moleküler genetik tekniklerde oligonükleotitlerin yarıştırmalı olarak kullanılmasının özgüllüğü arttırdığı bilinen bir gerçektir; özgül olan bir oligonükleotidin bulunduğu bir reaksiyon ortamında, özgül olmayan bir oligonükleotidin reaksiyona girme oranı, özgül olan bir oligonükleotidin bulunmadığı bir reaksiyon ortamına göre daha azdır. Ancak bu çalışmada böyle bir etki gözlenmemiştir, bütün problemler, özgül probun olduğu durumlarda da olmadığı durumlarda da son derece özgül bir performans sergilemişlerdir. Bu zaten beklenen bir durumdur, çünkü Şekil 5.1'de de görüleceği gibi, üç bakterinin de prob dizileri birbirinden oldukça farklıdır. Birbirine daha çok benzeyen *E. faecalis* ve *S. aureus*'un dizilerinde bile 4 adet farklı nükleotit vardır. *E. coli*'nin prob dizisi ise diğer ikisinden oldukça farklıdır. Bu sebeple özgül problemlerin olmadığı reaksiyonlarda da özgül olmayan sinyalin alınmaması şarttır. Ancak birbirine daha çok benzeyen, örnek olarak bir veya iki adet farklı nükleotidi olan problemlerin kullanıldığı bir reaksiyonda, yarışmalı problemlerin kullanımının özgüllüğü artırıcı etkisini gözlemlemek beklenilebilir.

<i>E. faecalis</i>	CTAAGTGTG GAGGGTTCC GCCCT-TCAG TGCTG
<i>S. aureus</i>	CTAAGTGTTA GGGGGTTCC GCCCC-TTAG TGCTG
<i>E. coli</i>	CTTGAGGTT GTGCCCTT-- GAGGCGTGGC TTCCG

Şekil 5.1 Üç bakteri için prob dizilerinin hizalanması, altı çizili bölgeler problemlerin eşlenik olduğu bölgelerdir

Probları yarışmalı olarak kullanmak, özgüllüğü arttırmasının yanında, çokluluk kapasitesini de önemli oranda arttırmaktadır. Yarışmalı prob tasarımında tüm problemler için primerler ortak olduğundan, aynı reaksiyon içinde başka bir örneğin tiplendirilmesinin yapılması için, reaksiyona eklenmesi gereken tek şey, o türe özgü probdur.

Probların yarışmalı olarak kullanılmasının C_t değerlerine bir etkisi olabilir; problemler aynı bölge için yarıştıklarından ortamda özgül olmayan problemlerin bulunması, özgül olan problemin bağlanma verimliliğini düşürebilir. Bunun sonucunda C_t değerlerinde bir artış gözlenmesi beklenebilir. Bu çalışmada problemler yarışmalı olarak kullanmanın C_t değerlerini çok etkilemediği gözlemlenmiştir; C_t değeri *E.coli* için 0,9 döngü ve *E.faecalis* için 0,5 döngü artarken, *S.aureus* için 0,5 döngü azalmıştır (Çizelge 4.4). Buradan hareketle eş zamanlı PCR için, düşük çokluluğa sahip (bu çalışma için üç) yarışmalı prob içermenin, C_t değerlerini önemli ölçüde etkilemediği çıkarımı yapılabilir.

5.2 Deteksiyon Alt Limitleri

Sepsis vakalarında kullanılacak tanı yöntemlerinde deteksiyon alt limiti önemlidir. Çünkü sepsisi olan hastanın kanında, belirli herhangi bir yoğunlukta mikroorganizma yoktur; yüksek olabileceği gibi çok düşük de olabilir. Aslında bir ml'lik kandan yapılan kültür sonucunda 1 – 2 koloni üremiş bile olsa, klinisyenler bu bilgiyi hastanın diğer belirtilerini de göz önüne alıp değerlendirebilmektedir. Bu sebepten dolayı literatürde kültür için rakam vermek yerine genel olarak “pozitif – negatif” değerlendirmesi yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada sepsisli hastaların kanındaki CONS miktarının 100 CFU/ml kandan fazla olabileceği gibi 20 CFU/ml kandan az da olabileceği bildirilmiştir (St Geme vd 1990).

Bu çalışmada tespit edilen deteksiyon alt limitleri, *E. coli* ve *S. aureus* için reaksiyon başına 100 bakterinin altında; *E. faecalis* için ise reaksiyon başına 10 bakterinin altındadır. Literatürde ise reaksiyon başına bir CFU bakteriye kadar inilebileceği gösterilmiştir (Mohammadi vd 2003). Ancak bunun sağlanabilmesi için anılan çalışmada kontaminasyon riskinin sifıra indirilmesi için birtakım önlemler alınmıştır. Kontaminasyon kaynağı çevreden, reaktiflerden veya önce çalışılan örneklerden kaynaklanabilir. Kontaminasyon riskini asgariye indirebilmek için yapılabilecekler şöyle sıralanabilir:

- Çevreden kaynaklanan bakteri kontaminasyonunu elimine etmek için, çalışmanın steril bir ortamda yapılması gerekmektedir. Ancak bu kontaminasyon kaynağı, hem önlenmesi kolay olduğundan hem de eş zamanlı PCR'da organizmaya özgül problemlerin kullanımından ve çevreden kaynaklanan kontaminasyon ajanının, kanda bulunabilecek bir kontaminasyon ajanı ile aynı olma ihtimalinin az olmasından dolayı, önemli bir kontaminasyon kaynağı değildir.
- Daha önce çalışılmış örneklerden kaynaklanabilecek kontaminasyon riskini elimine edebilmek için ise, PCR öncesi ve PCR sonrasında fiziksel olarak birbirinden ayrılması, pozitif ve negatif hava basınçları ile PCR sonrası bölümünden PCR öncesi bölüme hava akışının engellenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda bu iki ayrı bölümde kullanılan malzemelerin ayrı olması şarttır. PCR'da dTTP yerine dUTP kullanıp, reaksiyondan önce reaksiyon karışımını urasil-DNA-glikozilaz ile inkübe etme veya ortama morötesi ışık uygulama da, önceki reaksiyonlardan kaynaklanabilecek kontaminasyonu engellemede kullanılabilen metotlardandır (Dieffenbach ve Dveksler 2003).
- Kontaminasyon kaynaklarından bir diğeri de, reaktiflerden gelen kontaminasyondur. Özellikle Taq DNA polimeraz bakterilerden elde edildiği için, içinde az miktarda da olsa bakteri DNA'sı bulunabilir. Bu kontaminasyon kaynağını elimine etmek için PCR karışımını Sau3AI restriksiyon enzimi ile 37⁰C'ta 30 dk boyunca inkübe edip daha sonra enzim inaktivasyonu için 65⁰C'ta 20 dk inkübe etmek önerilmiştir. Bu metot kullanılarak reaksiyon başına 1 CFU alt sınırına (5 fg DNA) kadar inilebildiği bildirilmiştir (Mohammadi vd 2003; Reesink vd 2008). Başarılı olan diğeri bir metot ise PCR karışımını silika bazlı zar içeren kolondan geçirerek, içindeki kontamine edici DNA'nın zara bağlanarak karışımdan ayrılmasını sağlamaktır. Bunun da etkili bir metot olduğu gösterilmiştir; reaksiyon başına 1 CFU alt sınırında tespit yapılabilmektedir (Reesink vd 2008).

Benzer yaklaşımları uygulayarak, reaksiyon başına tek kopya bakteri DNA'sının tespit edebilen bir metot oluşturmak mümkündür. Ancak bir ml kandan tek kopya bakteriyi tespit edebilmek çok zordur. Bunun birkaç sebebi vardır:

- İzole edilen DNA'nın tamamının reaksiyona eklenmesi mümkün değildir. DNA izolasyon metotlarında DNA'yı çözmek için tavsiye edilen tampon miktarı genel olarak 50 – 200 µl arasındadır. Tek bir reaksiyona eklenen DNA miktarı ise genelde 25 µl reaksiyon için 2 – 5 µl'dir. Bunun sonucunda reaksiyona eklenen DNA miktarı, izole edilen DNA'nın 1/100 ile 1/10'unu oluşturmaktadır. Bu çalışmada, DNA konsantrasyonunu arttırmak için, kullandığımız izolasyon kitinde DNA'yı kolondan çözmek için tavsiye edilen 100 µl tampon yerine 30 µl tampon kullanılmıştır. Ancak çözücü miktarını azaltınca, konsantrasyon arttırırken, izolasyon verimi düşürmektedir. Bu sebeple daha da az miktarlarda çözücü tampon kullanmak uygun değildir.
- Aynı zamanda DNA izolasyon yöntemlerinde elde edilen DNA konsantrasyonu, kullanılan materyal ile doğru orantılı değildir. Diğer bir deyişle başlangıç materyalini fazla alsak bile, son DNA konsantrasyonunda o oranda bir artış olmayacağından dolayı, reaksiyon içine eklenen DNA miktarında da o oranda bir artış olamayacaktır.

Bütün bu bilgilerin ışığında, uygun kontaminasyon önleyici tedbirler alındıktan sonra, izole edilen kanın ve reaksiyonun hacmini arttırarak, bir ml kanda 10-15 bakteri deteksiyon limitine ulaşılabileceğini düşünmekteyiz. Daha düşük deteksiyon limitlerine ise ancak marjinal bir izolasyon metodu ile erişilebilir; mesela magnetik boncuklar ve bakteriye özgü yakalayıcı oligonükleotidler kullanılarak bakteri DNA'sını, insan genomik DNA'sından ayırma ve düşük hacimde çözme veya reaksiyon karışımına bu boncukları ekleme gibi.

Bu çalışmada tespit edilen 10 bakteri deteksiyon alt limiti ile yukarıda bahsi geçen 1 CFU/reaksiyon deteksiyon alt limitine ulaşılmış olan diğer çalışma (Mohammadi vd 2003) karşılaştırılırken dikkat edilmesi gereken nokta anılan çalışma yalnızca yaşayan bakterileri hesaba katan bir değerlendirme yapıyor iken bu tez çalışmasında bakteri miktar tayininde canlı-ölü bakteri ayrımı yapılmıyor olmasıdır. Buradan hareketle kontaminasyona yönelik özel bir tedbir alınmamış olmasına iki çalışmanın sonuçlarının karşılaştırılabilir olduğu ifade edilebilir.

Kültür metodunun tespit alt sınırı oldukça başarılıdır; bir ml kandaki bir bakteriyi bile bazı olgularda tespit edebilir. Ancak bu bakterinin canlı olması gerekmektedir. Bu noktada

eş zamanlı PCR'ın kültür yöntemine göre bir üstünlüğü de vardır; kültür yönteminde sadece canlı bakteriler gözlemlenirken, eş zamanlı PCR'da canlı bakteriler ile birlikte ölü bakterilerin de tespiti söz konusu olabilir. Ancak böyle bir durum için ölü bakterilerin, canlı bakterilere göre ne oranda olduğunun bilinmesi gerekmektedir. Literatürde bu çeşit bir çalışmaya rastlanamamıştır. Eş zamanlı PCR metodu ile kültür metodunun, antibiyotik tedavisi gören bir sepsis vakasından zaman içinde alınan kanların, her iki metot ile çalışılması ile ölü bakterilerin yöntemler üzerindeki etkisinin gözlemlendiği bir çalışma yapılabilir. Kültür için örnek alındığı esnada antibiyotik kullanılıyor olması, kültür başarısını belirgin ölçüde azaltırken, eş zamanlı PCR en azından antibiyotik tedavisinin ilk aşamalarında bu etkiden uzaktır.

5.3 Kod Çözme Yaklaşımı (Decoding)

Kod çözme yaklaşımı belli bir gruba ait çok sayıda türün, hızlı ve verimli olarak tanımlanmasında kullanılabilen genel bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımın çok farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Kod çözmenin avantajı tüm türlerin tiplendirilmesinin tür sayısından çok daha az deteksiyon aşaması ile gerçekleştirilebilmesidir. Mikrodizinlerin (microarray) yerleşimini rastgele oluşturup ve dizinlerin hangi noktasında hangi türün bulunduğunu saptamada kod çözme yaklaşımı mikrodizin üretiminde ciddi ekonomik kazanımlar sağladığı için kullanılmaktadır (Gunderson vd 2004). Yapılan işlem kısaca, her örnek için farklı sinyal verecek raportörler hazırlayıp, her deteksiyon aşamasında bu raportörlerin değişik kombinasyonlarını kullanmaktır. Bu yaklaşımda:

$$(\text{Tiplendirilecek toplam tür sayısı}) = (\text{deteksiyondaki kanal sayısı})^{(\text{deteksiyon sayısı})}$$

Yukarıdaki formülden de anlaşılacağı gibi, toplam tür sayısı deteksiyon sayısı ile üssel olarak bağlantılıdır. Örnek olarak üç kanallı bir deteksiyon sistemi kullanarak iki deteksiyon aşaması ile $3^2 = 9$ adet türe ait bireyin tiplendirilmesi yapılabilir. Kanallar örnek olarak A, B ve C adlandırılacak olursa, Çizelge 5.1'deki gibi bir kod çözme yaklaşımı geliştirilebilir.

Çizelge 5.1 Üç kanallı, iki deteksiyonlu örnek kod çözme yaklaşımı

Tür No	1. Deteksiyon Aşaması	2. Deteksiyon Aşaması
1	A	A
2	A	B
3	A	C
4	B	A
5	B	B
6	B	C
7	C	A
8	C	B
9	C	C

Bu yaklaşım ile örnek olarak; 1. deteksiyon aşamasında “B” sinyali verip, 2. deteksiyon aşamasında “C” sinyali veren örnek, 6. türe ait olarak tiplendirilecektir.

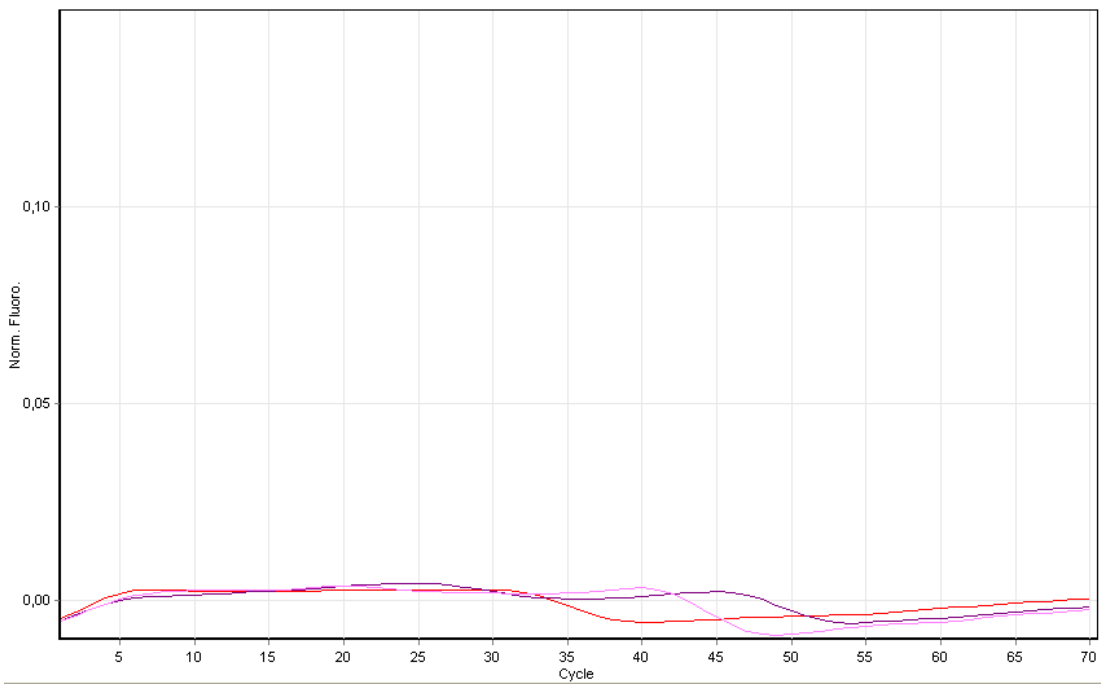
Yaptığımız çalışma kod çözme tekniğine uygun olarak tasarlanmıştır, şayet bakteri paneli genişletilmek isteniyorsa, eklenecek bakteriler için de aynı bölgelerden problemler tasarlanarak, bu çalışmada kullanılan 5 kanallı deteksiyona sahip bir eş zamanlı PCR cihazı ile, sadece 2 reaksiyonda teorik olarak $5^2 = 25$ adet bakterinin tiplendirilmesi yapılabilir. Şayet problemlerin tasarlandığı korunmamış bölgenin heterojenitesi yeterli ise farklı deteksiyon aşamalarında aynı bölgeler kullanılabilir, şayet yeterli değilse farklı deteksiyon aşamalarında farklı bölgeler de kullanılabilir.

Kod çözme tekniğinin bir dezavantajı, sadece oluşturulan panel içerisinde bir tiplendirme yapabilmesidir. Bu aslında genel bir sorundur, gerek mikrobiyoloji alanında olsun gerek başka alanlarda olsun kullanılan testlerin çok büyük bir bölümü “evrensel” değildir. Bu sebepten dolayı bu durum sadece kültür metodu ile karşılaştırıldığı zaman bir dezavantajdır. Kültür metodu da tam anlamı ile “evrensel” olmasa da (kültürü yapılamayan, yapılması zor olan veya özel koşullar gerektiren bakteriler mevcuttur), herhangi bir panelle de sınırlı değildir.

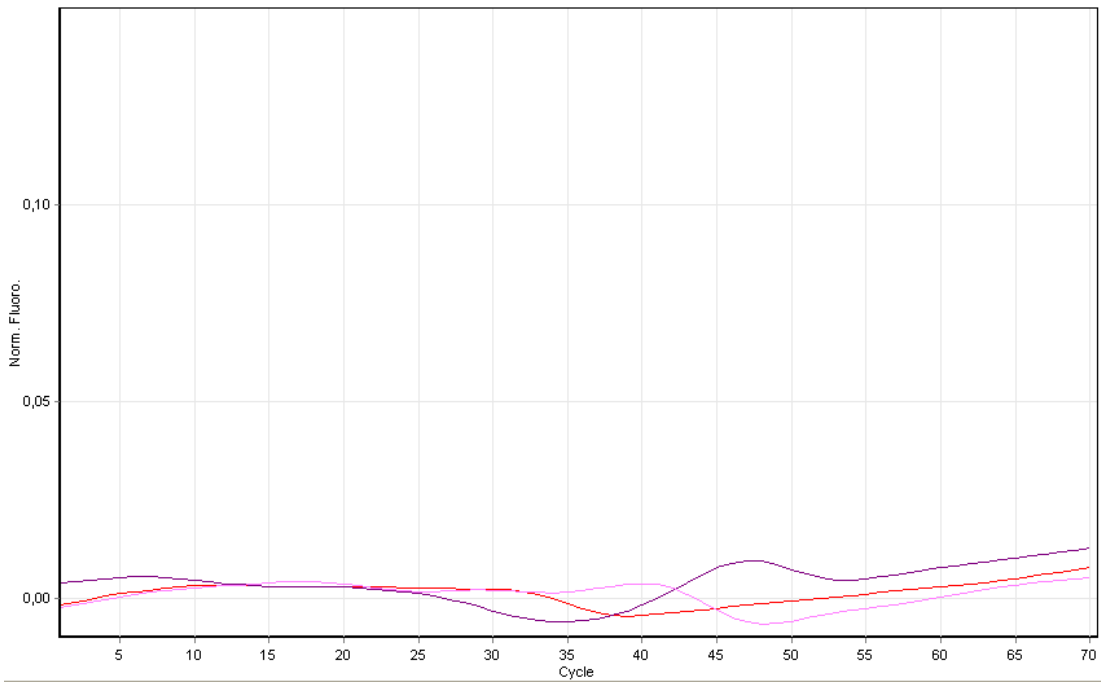
5.4 TÜBİTAK Projesi ve İleri Çalışmalar

Bu tez, TÜBİTAK 1507 ArGe Başlangıç Destek Programı, 7070521 nolu projesinin bir parçası olarak yapılmıştır. Bu tez yazım aşamasında iken, TÜBİTAK projesinin çalışmaları devam etmekteydi. Projede yenidoğan sepsislerinde sık görülen 9 bakteri ve 3 mantar türünün tiplendirilmesi yapılmaya çalışılmaktadır. Bakterilerin tiplendirilmesi kod çözme yöntemine göre yapılmaktadır. 4 kanallı deteksiyon ile 2 tüpte tiplendirme yapmak amaçlanmıştır.

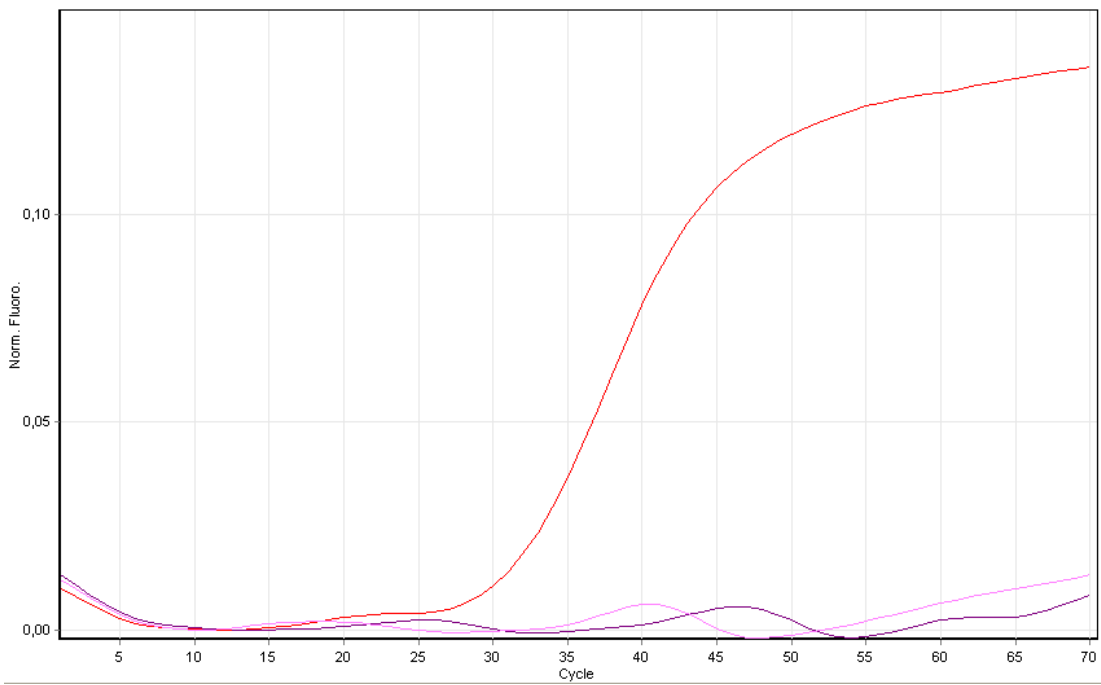
Proje kapsamında denenen gerçek yenidoğan sepsisi vakalarında başarılı sonuçlar alınmıştır. Şekil 5.2, Şekil 5.3, Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'te görüldüğü gibi, gerçek bir sepsis vakasında Turuncu kanaldan çok yüksek bir sinyal alınırken, diğer kanallardan sinyal alınmamıştır. Bu deneme yapıldığı aşamada kod çözme yönteminin ikinci reaksiyonu için problemler hazır olmadığından tam bir tiplendirme yapılamamış, ancak alınan bu sonuç ile sepsis ajanının *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* veya CONS türlerinden bir tanesi olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra alınan kültür sonucunun CONS çıkması ise yapılan testi doğrulamıştır.



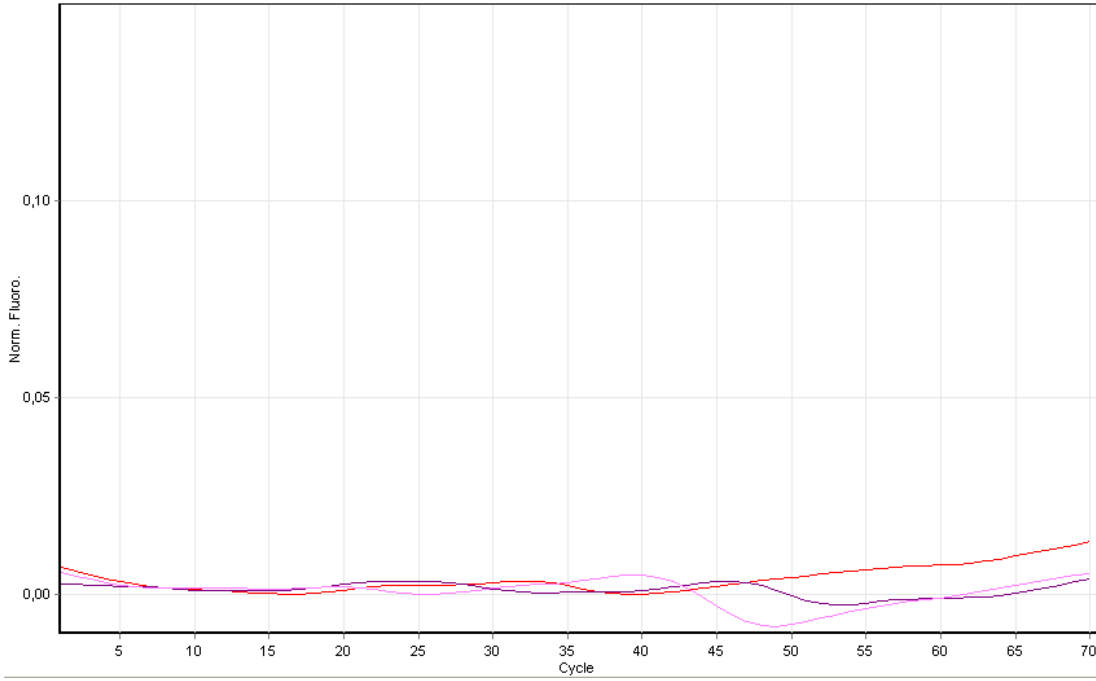
Şekil 5.2 Gerçek sepsis vakası – Yeşil kanal



Şekil 5.3 Gerçek sepsis vakası – Sarı kanal



Şekil 5.4 Gerçek sepsis vakası – Turuncu kanal



Şekil 5.5 Gerçek sepsis vakası – Kırmızı kanal

5.5 Sonuç

Yenidoğan sepsisinin tanısındaki yetersizlik günümüzde de devam etmektedir. Bu yetersizliğe nihayi çözümün moleküler genetik tekniklerinin getireceği düşünülmektedir. Eş zamanlı PCR da günümüzde yaygın olarak kullanılan moleküler tekniklerden biridir. Yaptığımız çalışmada hızlı, güvenilir, esnek ve düşük maliyetli bir eş zamanlı PCR yaklaşımı geliştirilmiş, geliştirilen bu yaklaşım kültür uygulamasını ortadan kaldırmamakla beraber kültür ile paralel olarak rutinde uygulanabilir bir yaklaşım olarak ortaya koyulmuştur.

KAYNAKLAR

- Amyes, SG. 2007. *Enterococci* and *Streptococci*. Int. J. Antimicrob. Agents, 29 Suppl 3: S43–52.
- Anonim 2006. NanoDrop Technologies, Inc. ND-1000 Spectrophotometer V3.3 User's Manual. p 13.1.
- Anonim 2008a. MerckManual, Sepsis and Septic Shock.
<http://www.merck.com/mmpe/sec06/ch068/ch068a.html?qt=sepsis%20and%20septic%20shock&alt=sh>.
- Anonim 2008b. MerckManual, Neonatal Sepsis.
<http://www.merck.com/mmpe/sec19/ch279/ch279m.html?qt=neonatal%20sepsis&alt=sh>.
- Anonim 2008c. ABgene®, Guide QPCR probe design.
www.abgene.com/downloads/Guide_QPCR-probedesign.pdf
- Arnon, S. Litmanovitz, I. 2008. Diagnostic tests in neonatal sepsis. Curr Opin Infect Dis, Jun;21(3):223-7.
- Bainer, R. Park, H. Cluzel, P. 2003. A high-throughput capillary assay for bacterial chemotaxis. J Microbiol Methods, Oct;55(1):315-9.
- Bartlett, JMS. Stirling, D. 2003. Methods In Molecular Biology - PCR Protocols. Humana Press Inc. p 81-88.
- Becker-André, M. Hahlbrock, K. 1989. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). Nucleic Acids Res, Nov 25;17(22):9437-46.
- Benjamin, DK Jr. Ross, K. McKinney, RE Jr. Benjamin, DK. Auten, R. Fisher, RG. 2000. When to suspect fungal infection in neonates: A clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. Pediatrics, Oct;106(4):712-8.
- Bentley, R. Meganathan, R. 1982. Biosynthesis of Vitamin K (menaquinone) in Bacteria. Bacteriological Reviews, 46(3):241-280.
- Birben, E. 2006. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Astım Allerji İmmünoloji, 4(2):92-94.
- Bustin, SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol, Aug;29(1):23-39.
- Caviness, AC. Demmler, GJ. Almendarez, Y. Selwyn, BJ. 2008. The prevalence of neonatal *Herpes simplex* virus infection compared with serious bacterial illness in hospitalized neonates. J Pediatr, Aug;153(2):164-9.

- Cheng, MF. Chiou, CC. Liu, YC. Wang, HZ. Hsieh, KS. 2001. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. J Clin Microbiol, Apr;39(4):1608-11.
- Chou, Q. Russell, M. Birch, DE. Raymond, J. Bloch, W. 1992. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Research, 20 1717–1723.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res, Nov 25;16(22):10881-90.
- Del Vecchio, A. Laforgia, N. Capasso, M. Iolascon, A. Latini, G. 2004. The role of molecular genetics in the pathogenesis and diagnosis of neonatal sepsis. Clin Perinatol, Mar;31(1):53-67.
- Dieffenbach, CW. Dveksler, GS. 2003. PCR Primer: A Laboratory Manual. CSHL Press, p 5-13.
- Dixson, S. Brumfitt, W. Hamilton-Miller, JM. 1985. In vitro activity of six antibiotics against multiresistant *staphylococci* and other gram-positive cocci. Eur J Clin Microbiol, 4 (1): 19–23.
- Dworkin, M. Falkow, S. 2006. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Springer, p 59.
- Freeman, WM. Walker, SJ. Vrana, KE. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques, Jan;26(1):112-22, 124-5.
- Gerdes, JS. 2004. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. Pediatr Clin North Am, Aug;51(4):939-59.
- Gibbs, RA. 1990. DNA amplification by the polymerase chain reaction. Anal Chem, Jul 1;62(13):1202-14.
- Gilliland, G. Perrin, S. Blanchard, K. Bunn, HF. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A, Apr;87(7):2725-9.
- Golden, SM. Stamilio, DM. Faux, BM. dela Cruz, WP. Shoemaker, CT. Blackmon, CL. Stassen, SD. Clark, VM. Smith, JW. Johnson, OL. 2004. Evaluation of a real-time fluorescent PCR assay for rapid detection of Group B Streptococci in neonatal blood. Diagn Microbiol Infect Dis. Sep;50(1):7-13.
- Gunderson, KL. Kruglyak, S. Graige, MS. Garcia, F. Kermani, BG. Zhao, C. Che, D. Dickinson, T. Wickham, E. Bierle, J. Doucet, D. Milewski, M. Yang, R. Siegmund, C. Haas, J. Zhou, L. Oliphant, A. Fan, JB. Barnard, S. Chee, MS. 2004. Decoding randomly ordered DNA arrays. Genome Res, May;14(5):870-7.
- Higuchi, R. Dollinger, G. Walsh, PS. Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y), Apr;10(4):413-7.

- Higuchi, R. Fockler, C. Dollinger, G. Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, Sep;11(9):1026-30.
- Ji, Y. 2007. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Protocols. Humana Press, p 1.
- Kluytmans, J. van Belkum, A. Verbrugh, H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev*, 10 (3): 505–20.
- Kubitschek, HE. 1990. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J. Bacteriol*, 172 (1): 94–101.
- Kumar, CS. Neelagund, YF. 2006. Non-*albicans Candida* in neonatal candidemia. *Indian Pediatr*, Sep;43(9):825.
- Lindahl, T. Ljungquist, S. Siegert, W. Nyberg, B. Sperens, B. 1977. DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, 252 (10): 3286-94.
- Lo, YMD. 1998. *Methods in molecular medicine, clinical applications of PCR*. Springer, p 3-6,27-28.
- Ludwig, W. Seewaldt, E. Kilpper-Bälz, R. Schleifer, KH. Magrum, L. Woese, CR. Fox, GE. Stackebrandt, E. 1985. The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Gen Microbiol*, Mar;131(3):543-51.
- Ma, JS. Chen, PY. Chen, CH. Chi, CS. 2000. Neonatal fungemia caused by *Hansenula anomala*: a case report. *J Microbiol Immunol Infect*, Dec;33(4):267-70.
- Mathur, NB. 1996. Neonatal Sepsis. *Indian Pediatr*, Aug;33(8):663-74.
- McCoy, ST. 2001. Neonatal sepsis. *Adv Nurse Pract*, Jun;9(6):89-92.
- Mishra, UK. Jacobs, SE. Doyle, LW. Garland, SM. 2006. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, May;91(3):F208-12.
- Mohammadi, T. Reesink, HW. Vandenbroucke-Grauls, CM. Savelkoul, PH. 2003. Optimization of real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of eubacterial 16S ribosomal DNA in platelet concentrates. *J Clin Microbiol*, Oct;41(10):4796-8.
- Mtitimila, EI. Cooke, RW. 2004. Antibiotic regimens for suspected early neonatal sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*, Oct 18;(4):CD004495.
- Mullis, K. Faloona, F. Scharf, S. Saiki, R. Horn, G. Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263-73.
- Ng, PC. 2004. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, May;89(3):F229-35.

- Ng, PC. Lam, HS. 2006. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr*, Apr;18(2):125-31.
- Overall, JC Jr. 1994. *Herpes simplex* virus infection of the fetus and newborn. *Pediatr Ann*, Mar;23(3):131-6.
- Phongsamart, W. Yoksan, S. Vanaprapa, N. Chokephaibulkit, K. 2008. *Dengue* virus infection in late pregnancy and transmission to the infants. *Pediatr Infect Dis J*, Jun;27(6):500-4.
- Rao, S. Ali, U. 2005. Systemic fungal infections in neonates. *J Postgrad Med*, 51 Suppl 1:S27-9.
- Reesink, HW. Mohammadi, T. Pietersz, RN. Savelkoul, PH. 2008. Rapid screening by real-time 16S rDNA PCR for bacterial contamination of blood products. *Clin Chem Lab Med*, 46(7):954-62.
- Reich, JD. Huddleston, K. Jorgensen, D. Berkowitz, FE. 1997. Neonatal *Torulopsis glabrata* fungemia. *South Med J*, Feb;90(2):246-8.
- Ryan, KJ. Ray, CG. Sherris, JC. 2003. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed. McGraw-Hill Professional, p 294.
- Sachse, K. Frey, J. 2003. *Methods in Molecular Biology - PCR Detection of Microbial Pathogens*. Humana Press Inc. p 4-9.
- Salyers, AA. Whitt, DD. 2002. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*, 2nd edition. ASM Press, p 14.
- Sanchez, PJ. Cooper, BH. 1987. *Candida lusitanae*: sepsis and meningitis in a neonate. *Pediatr Infect Dis J*, Aug;6(8):758-9.
- Sankar, MJ. Agarwal, R. Deorari, AK. Paul, VK. 2008. Sepsis in the newborn. *Indian J Pediatr*, Mar;75(3):261-6.
- St Geme, JW 3rd. Bell, LM. Baumgart, S. D'Angio, CT. Harris, MC. 1990. Distinguishing Sepsis From Blood Culture Contamination in Young Infants With Blood Cultures Growing Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Pediatrics*, Vol. 86 No. 2 August, pp. 157-162.
- Sussman, M. 1997. *Escherichia Coli: Mechanisms of Virulence*. Cambridge University Press, p 3-4.
- Syvänen, AC. Bengtström, M. Tenhunen, J. Söderlund, H. 1988. Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Res*, Dec 9;16(23):11327-38.
- Taskin, E. Kilic, M. Aygun, AD. Akarsu, S. Kurt, AN. 2004. Antibiotic Resistance of Bacterial Agents Isolated in a Neonatal Intensive Care Unit in Eastern Turkey. *J Trop Pediatr*, Apr;50(2):124-6.

- Téllez-Castillo, CJ. Gil-Fortuño, M. Centelles-Sales, I. Sabater-Vidal, S. Pardo Serrano, F. 2008. *Trichosporon asahii* fatal infection in a preterm newborn. Rev Chilena Infectol, Jun;25(3):213-5.
- van der Velden, VH. Hochhaus, A. Cazzaniga, G. Szczepanski, T. Gabert, J. van Dongen, JJ. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia, Jun;17(6):1013-34.
- Ventura, KC. Hawkins, H. Smith, MB. Walker, DH. 2001. Fatal neonatal echovirus 6 infection: autopsy case report and review of the literature. Mod Pathol, Feb;14(2):85-90.
- Verboon-Maciolek, MA. Krediet, TG. Gerards, LJ. de Vries, LS. Groenendaal, F. van Loon, AM. 2008. Severe neonatal *parechovirus* infection and similarity with *enterovirus* infection. Pediatr Infect Dis J, Mar;27(3):241-5.
- Vergnano, S. Sharland, M. Kazembe, P. Mwansambo, C. Heath, PT. 2005. Neonatal sepsis: an international perspective. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, May;90(3):F220-4.
- Walker, JV. 2006. Diagnostic Bacteriology Protocols. Humana Press Inc, p 70.
- Wang, AM. Doyle, MV. Mark, DF. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A, Dec;86(24):9717-21.
- Whitcombe, D. Theaker, J. Guy, SP. Brown, T. Little, S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotechnology, 17 804–807.
- Wiley, J. 2002. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.p 1.1.1.
- Wong, ML. Medrano, JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, Jul;39(1):75-85.
- Yusuf, K. Soraisham, AS. Fonseca, K. 2007. Fatal *influenza* B virus pneumonia in a preterm neonate: case report and review of the literature. J Perinatol, Oct;27(10):623-5.

EKLER

EK 1: *Escherichia coli* 16S rRNA Geni Dizisi

>S000711522 *Escherichia coli* 536; CP000247

```
AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCAGGCCTAACA
CATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAATCAGCTTGCTGATTCGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTG
GAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTC
GGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAA
AGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACAC
TGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTG
CTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTG
CATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTT
GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCACG
GAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC
CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCG
CGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA
CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTT
GCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATT
CATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGG
ATCACCTCCTTA
```

EK 2: *Enterococcus faecalis* 16S rRNA Geni Dizisi

>S000001976 *Enterococcus faecalis*; LMG 7937; AJ301831

```
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAA
GTCGAACGCTTCTTCCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTT
GGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGA
AAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTA
GTAAGTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA
CCGGGNNGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGC
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCG
CTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAG
GCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA
GTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAG
GTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGAAGGGT
GCGGCTGGATCACCTCCTT
```

EK 3: *Staphylococcus aureus* 16S rRNA Geni Dizisi

>S000000257 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (T); ATCC 12600; X68417

```
TTTTATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAT
ACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG
AAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAA
GACGGTCTTGCTGTCACCTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAA
GGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAA
CTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
GGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTG
ACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAA
GTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAG
CGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTA
GTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCAT
GCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTATTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAG
AGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTGCGAA
GGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG
TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT
```

EK 4: Korunmuş/Korunmamış Bölgelerin Tespiti İçin Dizi Hizalama Sonuçları

Multalin version 5.4.1
Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996

	1					50
<i>E. coli</i>	AAATTGAAGA	GTTTGATCAT	GGCTCAGATT	GAACGCTGGC	GGCAGGCCTA	
<i>E. faecalis</i>	AGA	GTTTGATCCT	GGCTCAGGAC	GAACGCTGGC	GGCGTGCCTA	
<i>S. aureus</i>						
Consensusaga	gtttgatc.t	ggctcag...	gaacgctggc	ggc..gccta	
	51					100
<i>E. coli</i>	ACACATGCAA	GTCGAACGGT	AACAGGAATC	AGCTTGCTGA	TTCGCT----	
<i>E. faecalis</i>	ATACATGCAA	GTCGAACGCT	TCTTTCCTCC	CGAGTGCTTG	CACTCAATTG	
<i>S. aureus</i>						
Consensus	a.acatgcaa	gtcgaacg.tc	.g..tgct..	..c.c.....	
	101					150
<i>E. coli</i>	----GACGAG	TGGCGGACGG	GTGAGTAATG	TCTGGGAAAC	-TGCTTGATG	
<i>E. faecalis</i>	GAAAGAGGAG	TGGCGGACGG	GTGAGTAACA	CGTGGGTAAC	CTACCCATCA	
<i>S. aureus</i>						
Consensusga.gag	tggcggacgg	gtgagtaa..	..tggg.aac	.t.cc.....	
	151					200
<i>E. coli</i>	GAGGGGGATA	ACTACTGGAA	ACGGTAGCTA	ATACCGCATA	AC-----G	
<i>E. faecalis</i>	GAGGGGGATA	ACACTTGGAA	ACAGGTGCTA	ATACCGCATA	ACAGTTTATG	
<i>S. aureus</i>						
Consensus	gagggggata	ac...tggaa	ac.g..gcta	ataccgcata	ac.....g	
	201					250
<i>E. coli</i>	TCGCAAGACC	AAAGAG----	GGGACCTTC	GGGCCTCTTG	CCATCGGATG	
<i>E. faecalis</i>	CCGCATGGCA	TAAGAGTGAA	AGGCGCTTTC	GGGTGTC--G	CTGATGGATG	
<i>S. aureus</i>						
Consensus	.cgca.g.c.	.aagag....	.gg..c.ttc	ggg..tc..g	c....ggatg	
	251					300
<i>E. coli</i>	TGCCCAGATG	GGATTAGCTA	GTAGGTGGG	TAAAGGCTCA	CCTAGGCGAC	
<i>E. faecalis</i>	GACCCGCGGT	GCATTAGCTA	GTGGTGAGG	TAACGGCTCA	CCAAGGCGAC	
<i>S. aureus</i>	GCT	GCATTAGCTA	GTGGTAAGG	TAACGGCTTA	CCAAGGCAAC	
Consensus	..ccc..g.t	GcATTAGCTA	GtGGTgaGG	TAAcGGCTcA	CCaAGGcGAC	
	301					350
<i>E. coli</i>	GATCCCTAGC	TGGTCTGAGA	GGATGACCAG	CCACACTGGA	ACTGAGACAC	
<i>E. faecalis</i>	GATGCATAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	
<i>S. aureus</i>	GATACGTAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGA	ACTGAGACAC	
Consensus	GAT.C.TAGC	cGacCTGAGA	GGgTGAtCgG	CCACACTGGA	ACTGAGACAC	
	351					400
<i>E. coli</i>	GGTCCAGACT	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG	GGAATATTGC	ACAATGGGCG	
<i>E. faecalis</i>	GGCCAGACT	CCTACGGGAG	GCAGCAGTAG	GGAATCTTCG	GCAATGGACG	
<i>S. aureus</i>	GGTCCAGACT	CCTACGGGAG	GCAGCAGTAG	GGAATCTTCC	GCAATGGGCG	
Consensus	GGtCCAGACT	CCTACGGGAG	GCAGCAGTaG	GGAATcTTcc	gCAATGGgCG	
	401					450
<i>E. coli</i>	CAAGCCTGAT	GCAGCCATGC	CGCGTGATG	AAGAAGGCCT	TCGGGTIGTA	
<i>E. faecalis</i>	AAAGTCTGAC	CGAGCAACGC	CGCGTGAGTG	AAGAAGGTTT	TCGGATCGTA	
<i>S. aureus</i>	AAAGCCTGAC	GGAGCAACGC	CGCGTGAGTG	ATGAAGGTCT	TCGGATCGTA	
Consensus	aAAGcCTGAc	ggAGCaAcGC	CGCGTGagTG	AaGAAGGtCT	TCGGAtCgTA	

	451				500
<i>E. coli</i>	AAGTACTTTC	AGCGGGGAGG	AAGGGAGTAA	AGTTAATACC	TTTGC--TCA
<i>E. faecalis</i>	AAACTCTGTT	GTTAGAGAAG	AACAAGG--A	CGTTAGTAAC	TGAACGTCCC
<i>S. aureus</i>	AAACTCTGTT	ATTAGGGAAG	AACATAT--G	TGTAAGTAAC	TGTGCACATC
Consensus	AAactCTgTt	attaGgGAaG	AAca.ag..a	.GtTAgTAAc	TgtgC...cc
	501				550
<i>E. coli</i>	TTGACGTTAC	CCGCAGAAGA	AGCACCGGCT	AACTCCGTGC	CAGCAGCCGC
<i>E. faecalis</i>	CTGACGGTAT	CTAACCAGAA	AGCCACGGCT	AACTACGTGC	CAGCAGCCGC
<i>S. aureus</i>	TTGACGGTAC	CTAATCAGAA	AGCCACGGCT	AACTACGTGC	CAGCAGCCGC
Consensus	tTGACGgTAc	Ctaa.cAgaA	AGCcaCGGCT	AACTaCGTGC	CAGCAGCCGC
	551				600
<i>E. coli</i>	GGTAATACGG	AGGGTGCAAG	CGTTAATCGG	AATTACTGGG	CGTAAAGCGC
<i>E. faecalis</i>	GGTAATACGT	AGGTGGCAAG	CGTTGTCCGG	ATTTATGTTGGG	CGTAAAGCGA
<i>S. aureus</i>	GGTAATACGT	AGGTGGCAAG	CGTTATCCGG	AATTATGTTGGG	CGTAAAGCGC
Consensus	GGTAATACGt	AGGtgGCAAG	CGTTatcCGG	AaTTAtTGGG	CGTAAAGCGc
	601				650
<i>E. coli</i>	ACGCAGGCGG	TTTGTTAAGT	CAGATGTGAA	ATCCCCGGGC	TCAACCTGGG
<i>E. faecalis</i>	GCGCAGGCGG	TTTCTTAAGT	CTGATGTGAA	AGCCCCGGGC	TCAACCGGGN
<i>S. aureus</i>	GCGTAGGCGG	TTTTTTAAGT	CTGATGTGAA	AGCCCACGGC	TCAACCGTGG
Consensus	gCGcAGGCGG	TTT.TTAAGT	CtGATGTGAA	AgCCCccGGC	TCAACCGgGg
	651				700
<i>E. coli</i>	AACTGCATCT	GATACTGGCA	AGCTTGAGTC	TCGTAGAGGG	GGGTAGAATT
<i>E. faecalis</i>	NGGGTCATTG	GAAACTGGGA	GA CTTGAGTG	CAGAAGAGGA	GAGTGAATT
<i>S. aureus</i>	AGGGTCATTG	GAAACTGGAA	AACTTGAGTG	CAGAAGAGGA	AAGTGAATT
Consensus	agggtCATtg	GAAACTGG.A	aaCTTGAGTg	caGaAGAGGA	gaGTgGAATT
	701				750
<i>E. coli</i>	CCAGGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGAGATC	TGGAGGAATA	CCGGTGGCGA
<i>E. faecalis</i>	CCATGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGATATA	TGGAGGAACA	CCAGTGGCGA
<i>S. aureus</i>	CCATGTGTAG	CGGTGAAATG	CGCAGAGATA	TGGAGGAACA	CCAGTGGCGA
Consensus	CCatGTGTAG	CGGTGAAATG	CGtAGAgATa	TGGAGGAAcA	CCaGTGGCGA
	751				800
<i>E. coli</i>	AGGCGGCCCC	CTGACGAAG	ACTGACGCTC	AGGTGCGAAA	GCGTGGGGAG
<i>E. faecalis</i>	AGGCGGCTCT	CTGGTCTGTA	ACTGACGCTG	AGGCTCGAAA	GCGTGGGGAG
<i>S. aureus</i>	AGGCGACTTT	CTGGTCTGTA	ACTGACGCTG	ATGTGCGAAA	GCGTGGGGAT
Consensus	AGGCGgCtct	CTGGtCtgta	ACTGACGCTg	AgGtgCGAAA	GCGTGGGGAg
	801				850
<i>E. coli</i>	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGTCGACTT
<i>E. faecalis</i>	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGAGTGCTA
<i>S. aureus</i>	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGAGTGCTA
Consensus	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGagtgCTa
	851				900
<i>E. coli</i>	GGAGGTTGTG	CCCTTGAGGC	GTGGCTT-CC	GGAGCTAACG	CGTTAAGTCG
<i>E. faecalis</i>	AGTGTITGAG	GGTTTCCGCC	CTTCAGTGCT	GCAGCAAACG	CATTAAGCAC
<i>S. aureus</i>	AGTGTITAGG	GGTTTCCGCC	CCTTAGTGCT	GCAGCTAACG	CATTAAGCAC
Consensus	aGtGtT.G.G	ggtTTccGcC	ctt.agTgCt	GcAGCtAACG	CaTTAAGcac
	901				950
<i>E. coli</i>	ACCGCCTGGG	GAGTACGGCC	GCAAGGTTAA	AACTCAAATG	AATTGACGGG
<i>E. faecalis</i>	TCCGCCTGGG	GAGTACGACC	GCAAGGTTGA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG
<i>S. aureus</i>	TCCGCCTGGG	GAGTACGACC	GCAAGGTTGA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG
Consensus	tCCGCCTGGG	GAGTACGacC	GCAAGGTTgA	AACTCAAAGg	AATTGACGGG

	951				1000
<i>E. coli</i>	GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGATGC	AACGCGAAGA
<i>E. faecalis</i>	GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAAGC	AACGCGAAGA
<i>S. aureus</i>	GACCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAAGC	AACGCGAAGA
Consensus	GgCCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAaGC	AACGCGAAGA
	1001				1050
<i>E. coli</i>	ACCTTACCTG	GTCTTGACAT	CCACGGAAGT	TTCAGAGAT	GAGAATGTGC
<i>E. faecalis</i>	ACCTTACCAG	GTCTTGACAT	CCTTTGACCA	CTCTAGAGAT	AGAGCTTTCC
<i>S. aureus</i>	ACCTTACCAAA	ATCTTGACAT	CCTTTGACAA	CTCTAGAGAT	AGAGCCTTCC
Consensus	ACCTTACCag	gTCTTGACAT	CctttGAc.a	cTctAGAGAT	agagcttTcC
	1051				1100
<i>E. coli</i>	C-TTCGGGA-	ACCGTGAGAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTTCGT	CAGCTCGTGT
<i>E. faecalis</i>	C-TTCGGGG-	ACAAAGTGAC	AGGTGGTGCA	TGGTTGTTCGT	CAGCTCGTGT
<i>S. aureus</i>	CCTTCGGGGG	ACAAAGTGAC	AGGTGGTGCA	TGGTTGTTCGT	CAGCTCGTGT
Consensus	C.TTCGGGg.	ACaaaGtGAC	AGGTGgTGCA	TGGtGTTCGT	CAGCTCGTGT
	1101				1150
<i>E. coli</i>	TGTGAAATGT	TGGGTTAAGT	CCCACAACGA	GCGCAACCCT	TATCCTTTGT
<i>E. faecalis</i>	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCACAACGA	GCGCAACCCT	TATTGTTAGT
<i>S. aureus</i>	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCACAACGA	GCGCAACCCT	TAAGCTTAGT
Consensus	cGTGAgATGT	TGGGTTAAGT	CCCACAACGA	GCGCAACCCT	TAt.cTTaGT
	1151				1200
<i>E. coli</i>	TGCCAGCGGT	CCGGCCGGGA	ACTCAAAGGA	GACTGCCAGT	GATAAACTGG
<i>E. faecalis</i>	TGCCATCA-T	TTAGTTGGGC	ACTCTAGCGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
<i>S. aureus</i>	TGCCATCA-T	TAAGTTGGGC	ACTCTAAGTT	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
Consensus	TGCCAtCa.T	t.aGttGGGC	ACTCtAagga	GACTGCCgGT	GACAAACcGG
	1201				1250
<i>E. coli</i>	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCTTACG	ACCAGGGCTA
<i>E. faecalis</i>	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAATCATCAT	GCCCCTATG	ACCTGGGCTA
<i>S. aureus</i>	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAATCATCAT	GCCCCTATG	ATTGGGGCTA
Consensus	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAaTCATCAT	GcccCTAtG	AcctGGGCTA
	1251				1300
<i>E. coli</i>	CACACGTGCT	ACAATGGCGC	ATACAAAGAG	AAGCGACCTC	GCGAGAGCAA
<i>E. faecalis</i>	CACACGTGCT	ACAATGGGAA	GTACAACGAG	TCGCTAGACC	GCGAGGTCAAT
<i>S. aureus</i>	CACACGTGCT	ACAATGGACA	ATACAAAGGG	CAGCGAAACC	GCGAGGTCAA
Consensus	CACACGTGCT	ACAATGG..a	aTACAAaGaG	.aGCgA.acC	GCGAGgtCAa
	1301				1350
<i>E. coli</i>	GCGGACCTCA	TAAAGTGCCT	CGTAGTCCGG	ATTGGAGTCT	GCAACTCGAC
<i>E. faecalis</i>	GCAAATCTCT	TAAAGCTTCT	CTCAGTTCGG	ATTGCAGGCT	GCAACTCGCC
<i>S. aureus</i>	GCAAATCCCA	TAAAGTTGTT	CTCAGTTCGG	ATTGTAGTCT	GCAACTCGAC
Consensus	GCaAtCtCa	TAAAGtt..T	CtcAGTtCGG	ATTG.AGtCT	GCAACTCGaC
	1351				1400
<i>E. coli</i>	TCCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGTG	GATCAGAATG	CCACGGTGAA
<i>E. faecalis</i>	TGCATGAAGC	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	GATCAGCACG	CCGCGGTGAA
<i>S. aureus</i>	TACATGAAGC	TGGAATCGCT	AGTAATCGTA	GATCAGCATG	CTACGGTGAA
Consensus	T.CATGAAGc	cGGAATCGCT	AGTAATCGtg	GATCAGcAtG	CcaCGGTGAA
	1401				1450
<i>E. coli</i>	TACGTTCCCG	GGCCTTGTC	ACACCGCCCG	TCACACCATG	GGAGTGGGTT
<i>E. faecalis</i>	TACGTTCCCG	GGCCTTGTC	ACACCGCCCG	TCACACCACG	AGAGTTTGTA
<i>S. aureus</i>	TACGTTCCCG	GGTATTGTC	ACACCGCCCG	TCACACCACG	AGAGTTTGTA
Consensus	TACGTTCCCG	GGcCTTGTC	ACACCGCCCG	TCACACCACg	aGAGTttGTa

	1451		1500
<i>E. coli</i>	GCAAAGAAG	TAGGTAGCTT	AACCTTCGGG AGGGC-GCTT ACCACTTTGT
<i>E. faecalis</i>	ACACCCGAAG	TCGGTGAGGT	AACCTTTTGG GAGCCAGCCG CCTAAGGTGG
<i>S. aureus</i>	ACACCCGAAG	CCGGTGGAGT	AACCTTTTAG GAGCTAGCCG TCGAAGGTGG
Consensus	aCAcccGAAG	tcGGTgg.gT	AACCTTtt.G gaGccaGCcg .C.AaggTGg
	1501		1550
<i>E. coli</i>	GATTCATGAC	TGGGGTGAAG	TCGTAACAAG GTAACCGTAG GGGAAcCTGC
<i>E. faecalis</i>	GATAGATGAT	TGGGGTGAAG	TCGTAACAAG GTAGCCGTAT CGAAGGGTGC
<i>S. aureus</i>	GACAAATGAT	TGGGGTGAAG	TCGTAACAAG GTAGCCGTAT CGGAAGGTGC
Consensus	GAta.ATGAt	TGGGGTGAAG	TCGTAACAAG GTAgCCGTAt cGgAaggTGC
	1551		1570
<i>E. coli</i>	GGTGGATCA	CCTCCTTA	
<i>E. faecalis</i>	GGCTGGATCA	CCTCCTTT	
<i>S. aureus</i>	GGCTGGATCA	CCTCCTTTCT	
Consensus	GGcTGGATCA	CCTCCTTt..	

EK 5: Primer Dizileri ve Primer Tasarım Raporu

----- P R İ M E R İ L E R İ -----

Sequence: 5'-GGGGAGCAAACAGGATTAGATACC-3'

Length: 24;
% GC: 50; Tm C: 75; Composition: A:9 C:4 G:8 T:3

Criteria:

% GC: Min 40, Max 60; Tm C: Min 55, Max 80
Hairpin cutoff: 0.0 kcal;
Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
Reject >= 5 base runs; >= 3 G/C at 3' end
Meets criteria selected: YES

----- P R İ M E R T E R S -----

Sequence: 5'-ATCGAATTAAACCACATGCTCCAC-3'

Length: 24; Complementary strand
% GC: 41; Tm C: 75; Composition: A:9 C:8 G:2 T:5

Criteria:

% GC: Min 40, Max 60; Tm C: Min 55, Max 80
Hairpin cutoff: 0.0 kcal;
Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
Reject >= 5 base runs; >= 3 G/C at 3' end
Meets criteria selected: YES

<u>Primer Balance:</u>	<u>-A-</u>	<u>-B-</u>	<u>Comment</u>
Length	24	24	
% GC	50	41	9 % difference
Tm C	75	75	

Primer Cautions:

Runs of G/C at 3' end	2	1
Runs of bases (any)	4	3
Hairpins	OK	OK

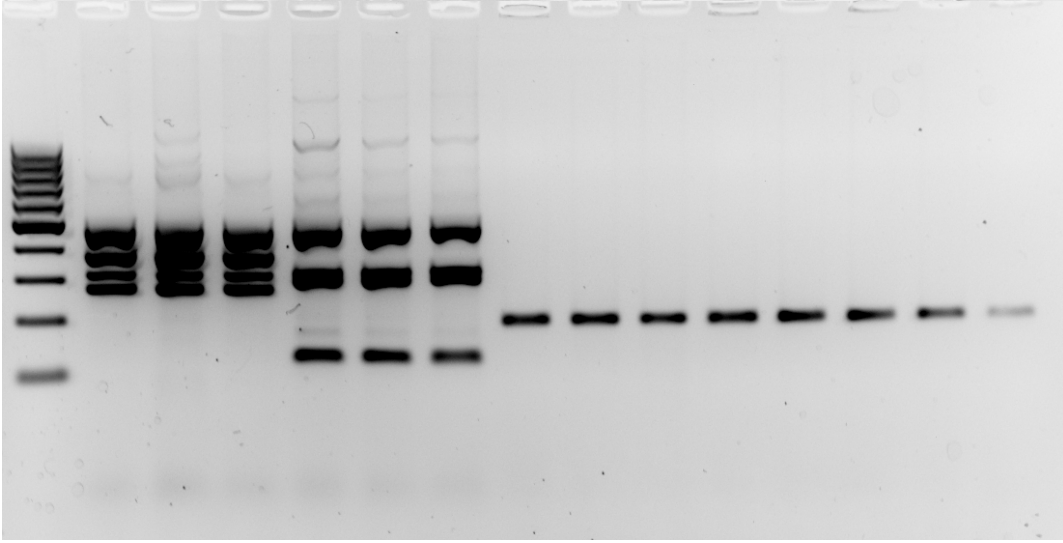
Primer Dimers:

	<u>A:A</u>	<u>B:B</u>	<u>A:B</u>
3'end matches	2	1	1
Any adj homol bases	2	4	6

Amplified product:

Size: 192 bps;
Melting temp: 78C
Annealing temp: 55C

EK 6: Şekil 4.4'teki Jel Görüntüsünün Aslı



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Haldun DOĞAN
Doğum Yeri : İzmit
Doğum Tarihi : 22.11.1979
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : 1994 – 1996 Ankara Fen Lisesi / ANKARA
: 1996 – 1997 Özel Nilüfer Lisesi / BURSA
Lisans : 1997 – 2002 Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat
Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ocak 2005 – Kasım 2007 : Montwell Ltd. Şti.
Kasım 2007 – : GenLAB Ltd. Şti.

Yayımları (SCI ve diğer)

- Ezgu F, Hasanoglu A, Okur I, Biberoglu G, Tumer L, Eminoglu T, Dogan H. 2008. Rapid screening of 10 common mutations in Turkish Gaucher patients using electronic DNA microarray. Blood Cells Mol Dis, Mar-Apr;40(2):246-7. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18035560