

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SEPSİS MODELLERİNDE GERÇEK ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE
ETKENLERİN SAPTANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali A. FOUAD

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşe KALKANCI

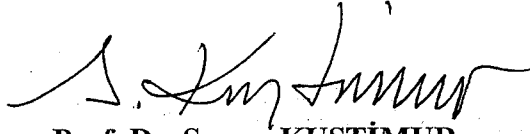
ANKARA

Haziran 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

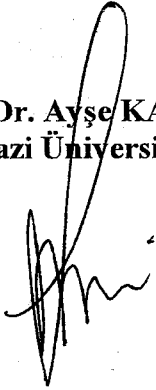
Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 23/06/2010

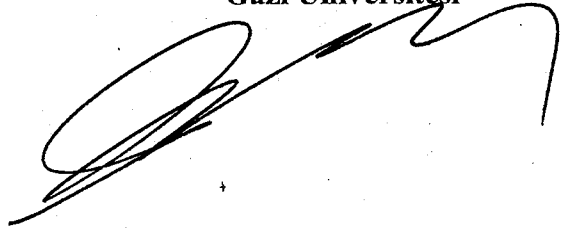


Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Ayşe KALKANCI
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
İçindekiler.....	II
Şekiller, Resimler, Grafikler	VI
Tablolar.....	VII
Kısaltmalar	VIII

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. Epidemiyoloji	7
2. 2. Etiyoloji.....	10
2. 3. Sepsis Patogenezi	12
2. 4. Doğal Bağışıklık	14
2. 5. Kazanılmış Bağışıklık	15
2. 6. Klinik Belirtiler ve Bulgular	16
2. 7. Sepsis Tanısı.....	17
2. 7. 1. Sepsis ayırıcı tanısında kullanılan testler.....	18
2. 6. 2. Sepsis etkenini tanımlayıcı testler.....	21
2. 8. Sepsis Prognozu.....	23
2. 9. Tedavi	23
2. 9. 1. Uygun antimikrobiyal tedavi	23
2. 9. 2. Çok yönlü destek tedavisi	27
2. 6. 5. Sepsiste deneysel tedaviler	31

2. 10. Sepsis Etkenlerinin Moleküller Yöntemlerle	
Tanımlanması.....	32
2. 11. DNA Boyaları Kullanılarak Gerçek Zamanlı PZR.....	36
2. 12. Özgül Problar Kullanılarak Gerçek Zamanlı PZR	37
2. 13. Çok Hedefli (Múltipleks) PZR	39
 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	 40
3. 1. Gereçler	40
3. 1. 1. Cihazlar.....	40
3. 1. 2. Kimyasallar	41
3. 1. 3. Kullanılan kitler	42
3. 1. 4. Kullanılan primerler ve enzimler.....	42
3. 1. 5. Besiyerleri	42
3. 1. 6. Mikroorganizma süspansiyonları	43
3. 1. 7. Ekstraksiyon ortamında kullanılan solüsyonlarının Hazırlanması.....	44
3. 2. Yöntem.....	46
3. 2. 1. Mikroorganizma kökenleri	46
3. 2. 2. Kültür koleksiyonundaki örneklerin canlandırılması	47
3. 2. 3. Hayvan modeli	47
3. 2. 4. Hayvan modellerinde sepsis oluşturma	48
3. 2. 5. Örneklerden total DNA eldesi	49
3. 2. 6. Örneklerin DNA'larının gerçek zamanlı PZR cihazında çoğaltılması	57

3. 2. 7. Bazı örneklerde DNA'ların çok hedefli PZR ile gösterilmesi	61
3. 2. 8. Kontaminasyona karşı alınan önlemler	65
4. BULGULAR.....	66
4. 1. Sepsis Etkenlerinin Gösterilmesi	66
4. 1. 1. Sepsis etkenlerinin kültürde üretilmesi.....	66
4. 1. 1. Sepsis etkenlerinin doğrulanması	69
4. 2. Moleküler Yöntemlerle Sepsis Tanımlanması	67
4. 2. 1. Nanodrop ile DNA miktarı ölçümü.....	67
4. 2. 2. Gerçek zamanlı PZR' ile sepsis etkenlerinin analizi.....	70
4. 3. Kontrol Grubunun Sonuçları	71
4. 4. Kan Örneklerinin Gerçek Zamanlı PZR Test Sonuçları	71
4. 5. Doku Örneklerinin Gerçek Zamanlı PZR Test Sonuçları	73
4. 6. Gerçek Zamanlı PZR Amplifikasyon Eğrileri	78
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ.....	98
7. ÖZET	102
8. SUMMARY	104

9. KAYNAKLAR	106
10. EKLER	120
11.ÖZGEÇMİŞ.....	122

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

Şekiller

Şekil 2.1: Sepsis Patogenezi	13
Şekil 2.2: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) basamakları	34
Şekil 2.3: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	34
Şekil 2.4: TaqMan Sistemi	38

Grafikler

Grafik 4.1: NanoDrop analiz ekranı örnek DNA ölçüm görüntüsü (kan örneği)	69
Grafik 4.2: NanoDrop analiz ekranı örnek DNA ölçüm görüntüsü (doku örneği)	70
Grafik 4.3: A ve C grup tavşanların <i>A. fumigatus</i> amplifikasyon eğrileri (kan örnekler)	78
Grafik 4.4: A ve C grup tavşanların <i>C. albicans</i> amplifikasyon eğrileri (kan örnekler)	78
Grafik 4.5: B grup tavşanların <i>S. aureus</i> amplifikasyon eğrileri (kan örnekler)	79
Grafik 4.6: C grup tavşanların <i>S. aureus</i> amplifikasyon eğrileri (kan örnekler)	79
Grafik 4.7: B ve C grup tavşanların <i>E. coli</i> amplifikasyon eğrileri (kan örnekler)	80

Grafik 4.8: A ve C grup tavşanların (<i>C. albicans</i> ve <i>A. fumigatus</i>) amplifikasyon eğrileri (kan örnekler).....	80
Grafik 4.9: B ve C grup tavşanların (<i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i>) amplifikasyon eğrileri (doku örnekler)	81
Grafik 4.10: Çok hedefli (<i>E. coli</i> ve <i>A. fumigatus</i>) PZR amplifikasyon eğrileri (kan örneği).....	81
Grafik 4.11: Çok hedefli (<i>E. coli</i> ve <i>C. albicans</i>) PZR amplifikasyon eğrileri (kan örneği).....	82
Grafik 4.12: Çok hedefli (<i>E. coli</i> ve C2 doku örneği) PZR amplifikasyon eğrileri	82
Grafik 4.13: Çok hedefli (<i>E. coli</i> ve <i>A. fumigatus</i>) PZR amplifikasyon eğrileri	83

TABLÖLAR

Tablo 2.1: Avrupa’da en sık izole edilen ilk 15 organizma ve yüzde oranları	9
Tablo 2.2: Sepsiste klinik belirtiler ve bulgular	16
Tablo 2.3: Sepsisli hastalarda ampirik antibiyotik seçenekleri.....	26
Tablo 3.1: Gerçek zamanlı PZR’ da kullanılan primer ve problemler.....	58
Tablo 3.2: Bakteri primerleri kullanarak; sepsis tanısı için hazırlanan TaqMan PZR karışımı	59
Tablo 3.3: Mantar primerleri kullanarak; sepsis tanısı için hazırlanan TaqMan PZR karışımı	60
Tablo 3.4: Çok hedefli (Múltipleks) PZR karışımı	61
Tablo 3.5: Gerçek zamanlı PZR’ da kullanılan LightCycler yazılım raporu (SYBR green)	63
Tablo 3.6: Gerçek zamanlı PZR’ da kullanılan LightCycler yazılım raporu (TaqMan).....	64
Tablo 4.1: Sepsisli kan örneklerinden elde edilen total DNA miktarları	68
Tablo 4.2: Sepsisli doku örneklerinden elde edilen total DNA miktarları	69
Tablo 4.3: Sepsisli tavşan kanlarının gerçek zamanlı PZR test sonuçları	72

Tablo 4.4: Dalak örneklerinin gerçek zamanlı PZR	
test sonuçları	74
Tablo 4.5: Böbrek örneklerinin gerçek zamanlı PZR	
test sonuçları	75
Tablo 4.6: Karaciğer örneklerinin gerçek zamanlı PZR	
test sonuçları	76
Tablo 4.7: Koloni örneklerinin gerçek zamanlı PZR	
test sonuçları	77
Tablo 4.8: Kontamine edilen kan örneklerinin gerçek zamanlı PZR	
test sonuçları	77
Tablo 5.1: Çok hedefli PZR yöntemi olan, ticari SeptiFast	
kiti ile tanımlanan mikroorganizmaların listesi.....	93

KISALTMALAR

ABD: Amerika birleşik devletleri

SiYS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ACCP: Amerika Göğüs Hastalıkları Uzmanları Koleji

SCCM: Yoğun Bakım Topluluğu

PiRO: Predisposition, insult infection, response, organ dysfunction

TNM: Tumor nod metastaz

NK: Doğal öldürücü hücreler

PAMP: Patojen ile ilişkili moleküler kalıplar

PRRs: Patern tanıyan reseptörler

TLR: Toll-like reseptörü

NF- κ B: Nükleer faktör kappa-B

AP-1: Protein 1 aktivatörü

TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa

IL-1 β : İnterlökin-1 β

IL-10: İnterlökin-10

Th1: T hücreleri tip 1

Th2: T hücreleri tip 2

IFN: İnterferon gamma

IL- 4: İnterlökin-4

IL-10: İnterlökin-10

ARDS: Akut solunum yetmezliği sendromu

TNF: Tümör nekroz faktör

CRP: C reaktif protein

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

PKT: Prokalsitonin

LPS: Lipopolisakkarid

HIV: İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü

DİK: Damar içi pıhtılaşma

Hct: Hematokrit testi

INR: Artmış protrombin zamanı

G-CSF: Granülosit-Koloni Stimüle Faktör

GM-CSF: Granülosit/ makrofaj Koloni Stimüle Faktör

rhAPC: Rekombinant insan aktive protein C

APACHE: Acute physiology and chronic health evaluation II

IL-1ra: İnterlökin -1 receptör antagonisti

PAF: Platelet aktivatör faktörü

SOD: Süperoksit dismutaz

NO: Nitrik oksit

dNTP: deoksinükleosid trifosfat

dsDNA: Çift sarmal DNA

ssDNA: Tek sarmal DNA

Real-Time PCR: Gerçek zamanlı PZR

FRET: Fluoresance resonance energy transfer

FAM : Karboksi floresin

TAMRA: Karboksi-tetrametil- rodamin

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

EPT: Eritrosit parçalama tamponu

LPT: Lökosit parçalama tamponu

SDS: Sodyum dodesil sülfat

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

GÜDAM: Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi

ATCC: American Type Culture Collection

FKİ: Fenol-kloroform-izoamil alkol

rRNA: Ribozomal RNA

GSPBRT: Gram-spesifik prob temelli gerçek zamanlı PZR

NASBA-MB: Nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon ve moleküler
işaretleme

ITS1: Internal transcribed spacer 1

LC-SF: LightCycler SeptiFast

rDNA: Ribozomal DNA

1. GİRİŞ

Sepsis, mikroorganizma veya toksinlerinin normalde steril olan dokularda bulunması ve burdan kana geçmesi sonucu vücudun bu invazyona verdiği yanıttır. Sepsis yıllar boyunca tedavi açısından ciddi problemler oluşturan ve yüksek mortaliteye neden olan bir sorundur. Mortalite 1960'larda %100 iken, günümüzde erken tanı ve tedavi ile mortalite azalmıştır. Ancak halen çocuklarda ölüm nedenleri arasında ilk on neden içindedir. ABD' de her yıl 250.000 erişkin sepsis nedeniyle kaybedilmektedir.^{1,2}

Sepsise bağlı ölümlerde yaş, enfeksiyon etkeni, enfeksiyonun kazanıldığı yer ve altta yatan primer hastalık önemlidir. Septik şoklu hastalarda mortalite değişmekle beraber yaklaşık %40 olarak bildirilmektedir.³ Erken tanı ve tedavi prognoz yönünden önemlidir. Sepsis konağın enfeksiyona karşı yanıtı olarak tanımlanmaktadır. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SİYS) erişkinler için geliştirilmiştir.⁴ Sepsise neden olan patojenlerin sıklığı enfeksiyonun edinildiği yere göre değişiklik gösterir.^{5,6}

Toplumda sepsis olgularında en sık görülen etkenler *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*'tur. Hastane içinde gelişen sepsis olgularında görülen mikroorganizmalar arasında birinci sırada gram negatif mikroorganizmalar gelmekle birlikte gram pozitif mikroorganizmalar ve mantarlar giderek artan oranda sepsise neden olmaktadır.⁷

Sepsis tanısında kan kültürü en değerli yöntem olarak kabul edilmektedir. Fakat kültürde kontaminasyona bağlı yalancı pozitiflik olduğu gibi, fatal bakteriyel enfeksiyona rağmen kan kültürü negatif de olabilmektedir. Bununla beraber kan kültüründe üreme olması için en az 24-48 saat, negatif olduğuna karar verebilmek için ise , en az 72 saat geçmesi gerekmektedir. Bu ise sepsis olgularında tedaviye başlanması için uzun bir zamandır.⁸

Son yıllarda sepsis etkenlerini saptamak ve tanısını koymak amacıyla moleküler yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada; sepsis oluşturulan deneysel hayvan modellerinde tek veya çoklu etken varlığında gerçek zamanlı PZR yönteminin etkinliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Sepsis, Yunanca çürüme, kokuşma ve bozulma anlamına gelmektedir. Eski çağlarda bir yaranın hava ile temasından sonra çürümesi ve kan akımına katılması ile bu tablonun oluştuğuna inanılmakta idi. Koch, Pasteur, Semmelweis ve Lister enfeksiyon ile ilişkili bilgileri açıkladıktan sonra, enfeksiyonun sepsise neden olduğu anlaşılmıştır. Ondokuzuncu yüzyıldan sonra, özellikle 1914’de Schottmueller’in çalışmalarıyla sepsisin bakteri enfeksiyonuna bağlı olduğu kabul edilmeye başlamıştır.⁹

Sepsis hastası çoklu organ yetersizliğine girerse, tablo ölüm ile sonuçlanmaktadır. Amerika Göğüs Hastalıkları Uzmanları Koleji (ACCP) ve Yoğun Bakım Topluluğu’nun (SCCM), konsensus konferansında sepsis, “enfeksiyonun yarattığı sistemik inflamasyon yanıtı sendromu (SİYS)” olarak tanımlanmıştır.¹⁰

Sepsis, homeostatik mekanizma ile endotel kaybına neden olmakta, bunun yanı sıra dolaşım sisteminin fonksiyonlarını ve hücre içi homeostazisi bozmaktadır. Organ disfonksiyonu ve ölüm sebebi, hücre hipoksisi ve apoptozdur. Sepsis spektrumu içerisinde yer alan bazı tanımlamalar aşağıda açıklanmaktadır.⁹

Enfeksiyon: Normalde steril olan bir dokuda, vücut sıvılarında veya boşluklarında mikroorganizmaların varlığı olarak tanımlanır. Fakat bu duruma konağın inflamatuvar yanıtının eşlik etmesi mutlaka gerekli değildir. Tablo asemptomatik, subklinik olarak da

seyredebilmektedir. Bu tanımlar hala 1991 uzlaşısı toplantısında tarif edildiği gibi kullanılmaktadır, ancak mükemmel bir kapsamı olmadığı da söylenebilmektedir. Bu kapsam dışında kalan enfeksiyonlara *Clostridium difficile* kolitini, ekzotoksinlerle oluşan hastalıkları ve mikrobiyolojik olarak doğrulanamamış, enfeksiyondan güçlü bir şekilde şüphelenilen sepsisi örnek olarak gösterebiliriz.⁴

Bakteriyemi: Kanda bakterilerin varlığının mikrobiyolojik kültür ile gösterilmesidir. Endokardit ve ciddi intravasküler enfeksiyonlarda sürekli bir bakteriyemi vardır. Diğer bütün bakteriyel enfeksiyonlarda geçici veya aralıklı bakteriyemi olabilmektedir. Benzer şekilde kanda diğer patojenlerin varlığı da buna uygun olarak viremi, fungemi, parazitemi olarak adlandırılır. Septisemi, bakteremi ile hemen hemen aynı anlamda ve zaman zaman birbirinin yerine kullanılan bir deyimdir. Bazı hekimler tarafından bakteremiden daha ağır, ateş ve sistemik yakınmaların eşlik ettiği klinik tablolar için kullanılmakta iken, verilerin yorumlanmasında karışıklığa neden olduğu için uzlaşısı toplantısında kabul edilen tanımlar arasından çıkarılmıştır.⁴

Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SİYS): Organizmanın çeşitli klinik etkiler tarafından tetiklenebilen genel inflamatuvar yanıtını tanımlamaktadır. Eşik düzeyi düşük ve oldukça özgül olmayan klinik bulguları içermektedir. Nedeni ne olursa olsun sistemik inflamasyonu gösteren, altta yatan sebebin hızla araştırılmasını ve erken tanıyı zorunlu kılan belirtiler ve semptomlar topluluğu olarak algılanmalıdır. Bu klinik kriterlere eklenebilecek biyokimyasal parametreleri araştırmak için yapılan çalışmalarda birçok sitokin ve akut faz belirtecinin dolaşımdaki seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Prognozun daha doğru belirlenmesini sağlayacak ve klinik uygulanabilirliği arttıracak yeni değişkenler

bulundukça, SİYS tanımı daha anlamlı hale geleceği düşünülmektedir. SİYS'nun gelişebileceği enfeksiyon dışı durumlara travmalar, yanıklar, akut pankreatit ve otoimmün mekanizmalarla gelişen organ hasarları örnek gösterilebilir.⁴

SİYS tanısında, aşağıda sıralanan dört bulgudan iki veya daha fazlasının olması aranır. Bunlar;

1. Vücut ısı > 38°C ya da < 36°C,
2. Kalp hızı > 90 atım / dakika,
3. Solunum hızı > 20 solunum/ dakika ya da PaCO₂ < 32 mmHg,
4. Lökosit sayısı > 12.000/ mm³ ya da < 4000 /mm³ ya da >%10, genç nötrofillerin saptanması.⁴

Sepsis: Enfeksiyona verilen sistemik inflamatuvar yanıttır. Klinik veya mikrobiyolojik olarak kanıtlanmış enfeksiyon varlığında yukarıda tarif edilen SİYS bulgularından iki veya daha fazlasının olmasıyla tanı konulmaktadır. Bu terim sistemik inflamasyon bulgularının doğrudan enfeksiyona bağlı olduğu durumlarda kullanılmalıdır. Ayrıca sepsisle birlikte hipoksemi, artmış kan laktat düzeyi, oligüri ve mental durum değişikliği gibi, organ perfüzyon bozukluğu belirtilerinden en az birinin bulunması durumunda, olgu tanımını vurgulamak için sepsis sendromu tanımı yapılmıştır.⁴

Ağır Sepsis: Sepsis ile birlikte organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun bulunması durumudur.

Hipoperfüzyon ve perfüzyon bozukluğunda, laktik asidoz, oligüri veya mental durumda akut değişiklik bulunabilir. Hastalık yalnız bu bulgularla sınırlı değildir.⁴

Sepsise Bağlı Hipotansiyon: Başka bir neden olmaksızın, 90 mmHg'dan düşük sistolik arteriyel kan basıncı veya 70 mmHg'dan düşük ortalama arteriyel kan basıncı olması veya başlangıç düzeyinden en az 40 mmHg'lık düşüş olması sepsisle alakalı hipotansiyon olarak tanımlanmıştır.⁴

Septik şok: Sepsiste, yeterli sıvı tedavisine rağmen, hipotansiyon ile birlikte perfüzyon bozukluğu belirtilerinin (laktik asidoz, oligüri, akut mental değişiklik) devam etmesi durumudur. Perfüzyon bozukluğu belirlendiği zaman inotropik veya vazopressör ilaç alanlarda hipotansiyon olmayabilir.⁴

Refrakter Septik Şok: Yeterli sıvı verilmesine ve farmakolojik destek (vazopressör ve inotrop destek) tedavisine rağmen bir saatten daha uzun süren hipotansiyondur.⁴

Çoklu Organ Yetersizliği Sendromu: Tedavisiz homeostaz sağlanmasının mümkün olmadığı, birden çok organ veya sistemin fonksiyonlarında yetersizlikle karakterize bir sendromdur.⁴

Bu tanımların epidemiyolojik veriler ve bilimsel çalışmalar için ortak bir dil oluşturması amaçlanmıştır. Bu nedenle hasta başında tanı

kriterleri uygulanırken, enfeksiyon dışında pek çok durumda bu klinik tablonun oluşabileceği veya sepsisin bu kriterlerin ötesinde çok değişik şekillerde karşımıza çıkabileceği unutulmamalıdır. Özellikle yaşlı hastalar başta olmak üzere, bağışıklık sistemi çökmüş olan, yoğun bakım hastalarında, antibiyotik tedavisi almakta olanlarda sepsis farklı bir tablo oluşturabilir. Açıklanamayan bir metabolik asidoz, bilirubin artışı, akut faz yanıtında artış, trombositopeni, hipotermi, hipotansiyon, taşikardi, genel durum bozukluğu veya konfüzyon tek başına sepsisin bir göstergesi olabilir. Ayrıca enfeksiyon odağına ve etkene göre de farklı bir klinik prezentasyon görülebilir.¹¹

Bu nedenle 2001 yılında yapılan yeni uzlaşa toplantısında sepsis tanı kriterleri arasına C-reaktif protein, prokalsitonin, laktik asit, kreatinin, bilirubin gibi birçok biyokimyasal belirtecin artması da dahil edilmiştir. Yine bu toplantıda sepsiste klinik evreleme için kullanılmak üzere PİRO (Predisposition, insult infection, respons, organ dysfunction) sistem adı verilen, onkolojide kullanılan “Tumor nod metastaz” sistemi (TNM) evrelemesine benzer bir sistem önerilmiştir. Bu sistem henüz klinik kullanıma girmemiştir.¹⁰

2. 1. Epidemiyoloji

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’inde her yıl yaklaşık 500,000 yeni olgu bildirilmekte olup, kaba ölüm oranı % 35’tir. Yeni tahminlere göre yılda 751,000 yeni sepsis olgusunun görüldüğü, 250,000’inin ölümle sonuçlandığı düşünülmektedir.¹² ABD’de 1979-2000 yılları arasını kapsayan, 22 yıllık bir çalışmada sepsis görülme sıklığının, yıllık %8.7’lik bir artışla, 82/100,000’ den 240/100,000’ e çıktığı

görülmüştür. Ölüm oranı 1979-1984 yılları arasında %28 iken 1995-2000 yılları arasında %18'e düşmüştür, fakat toplam kaybedilen hasta sayısı artmaya devam etmektedir.¹³

Türkiye'de yeterli veri yoktur, ancak ABD'ndeki oranlar Türkiye'nin nüfusuna uyarlandığında yılda 100,000 civarında sepsis görülmesi beklendiği söylenebilir. Hacettepe Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada 1983-1989 yılları arasında, hastanede yatan hastalar arasında gram negatif bakterilerle sepsis görülme sıklığı 4.2/1000 ve mortalitesi %45 olarak bulunmuştur.¹⁴

Sepsiste mortalite %30 olup, ciddi sepsisten septik şoka ve çoklu organ yetersizliği sendromuna doğru ilerleyen olgularda mortalite artmaktadır. Fonksiyon bozukluğu gelişen organ-sistem sayısı arttıkça mortalite da artar. Dört ve üzerindeki organ-sistem tutulumu varlığında mortalite %80'e varmaktadır.¹⁵ Sepsis etiyolojisinde 2000 yılında gram pozitifler %52.1, gram negatifler %37.6, polimikrobiyal enfeksiyon %4.7, mantarlar %4.6, anaeroblar %1.0 şeklinde saptanmıştır. Sepsisli hastaların çoğunda kan kültürlerinde üreme saptanamamaktadır. Bu oranlar sepsis evresiyle değişmekte olup, sepsiste %17, ciddi sepsiste %25 ve septik şokta ise % 69 olarak bulunmuştur.¹⁵

Avrupa'da 25 üniversite hastanesinin katıldığı, 9613 kan izolatının ve duyarlılıklarının irdelendiği bir çalışmada da yine gram pozitif mikroorganizmalar daha fazla bulunmuştur. İzole edilen organizmalar ve yüzdeleri tablo 2. 1' de görülmektedir.¹¹

Tablo 2. 1: Avrupa’da en sık izole edilen ilk 15 organizma ve yüzde oranları. ¹¹

Mikroorganizma	%
<i>Escherichia coli</i>	20.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	17.6
Koagülaz negatif stafilokoklar	17.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.3
<i>Enterobacter</i> spp.	3.9
<i>Candida</i> spp.	2.8
<i>Acinetobacter</i> spp.	2.6
<i>Viridans streptokoklar</i>	2.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.3
<i>Proteus mirabilis</i>	1.7
<i>Serratia</i> spp.	1.6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.1
<i>Salmonella</i> spp.	1.1

Sadece yoğun bakımda saptanan bakteriemi etkenleri incelendiğinde bu oranlarda değişiklikler görülebilmektedir. *Pseudomonas* türlerinde %19’a (%92 *Pseudomonas aeruginosa*, %8 diğer *Pseudomonas* türleri), enterokoklarda %12’ye, *Candida* türlerinde %7’ye varan oranlar bildirilmiştir.¹¹

Fungal sepsis görülme sıklığı bakterilere göre düşük olmasına rağmen, gittikçe artmaktadır.¹³

Paris’te 22 yoğun bakım ünitesinin 1993-2000 arası verileri taranmış ve sepsis epidemiyolojisi değerlendirilmiştir.¹⁶

Almanya'da sepsis görülme sıklığının 1000'de 8-15 olduğu, Avrupa Ortak Pazar ülkelerinde 1995 yılında 1.5 milyon sepsis teşhis edildiği ve yoğun bakım ünitelerindeki hastaların yaklaşık yarısının (%44.8) enfekte olduğu, 2000'de septik şokta mortalitenin %55.9 olduğu, komplike olmayanların %40, komplike olanların (septik şok, multipl organ yetmezliği) %80 oranında kaybedildiği, sepsisli olgular için yılda 17 milyar dolar harcandığı bildirilmektedir.¹⁷

Toplum kaynaklı sepsislerde pyelonefrit, pnömoni, deri-yumuşak doku enfeksiyonları, kolanjit-kolesistit, menenjit, endokardit en sık karşılaşılan odaklardır. Hastane kaynaklı sepsislerde ise üriner sonda ilişkili pyelonefrit, ventilatörle ilişkili pnömoni, karın içi enfeksiyon (sekonder peritonit, apse) ve yabancı cisim enfeksiyonları (damar içi kateterler, ventrikülo-peritoneal kateterler) en sık odaklardır. Son 20 yıldır yapılan klinik çalışmalar hangi hastalarda sepsis gelişebileceği ve nasıl engellenebileceği üzerine odaklanmıştır.^{18,19,20,21,22,23}

2. 2. Etiyoloji

Sepsis etiyolojisinden birçok bakteriyel etken sorumludur. Antibiyotiklerin kullanıma girmeden önce streptokoklar ve stafilokoklar en sık sepsis nedeni olan bakterilerdi. Antibiyotik döneminde ise gram negatif bakteriler gittikçe artan oranlarda sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır. Son 10 yılda gram pozitif bakterilerin sepsis etkeni olarak izole edilme oranları artmaktadır. Özellikle stafilokok kaynaklı sepsislerin görülme sıklığındaki artış dikkati çekmektedir.^{24,25,26}

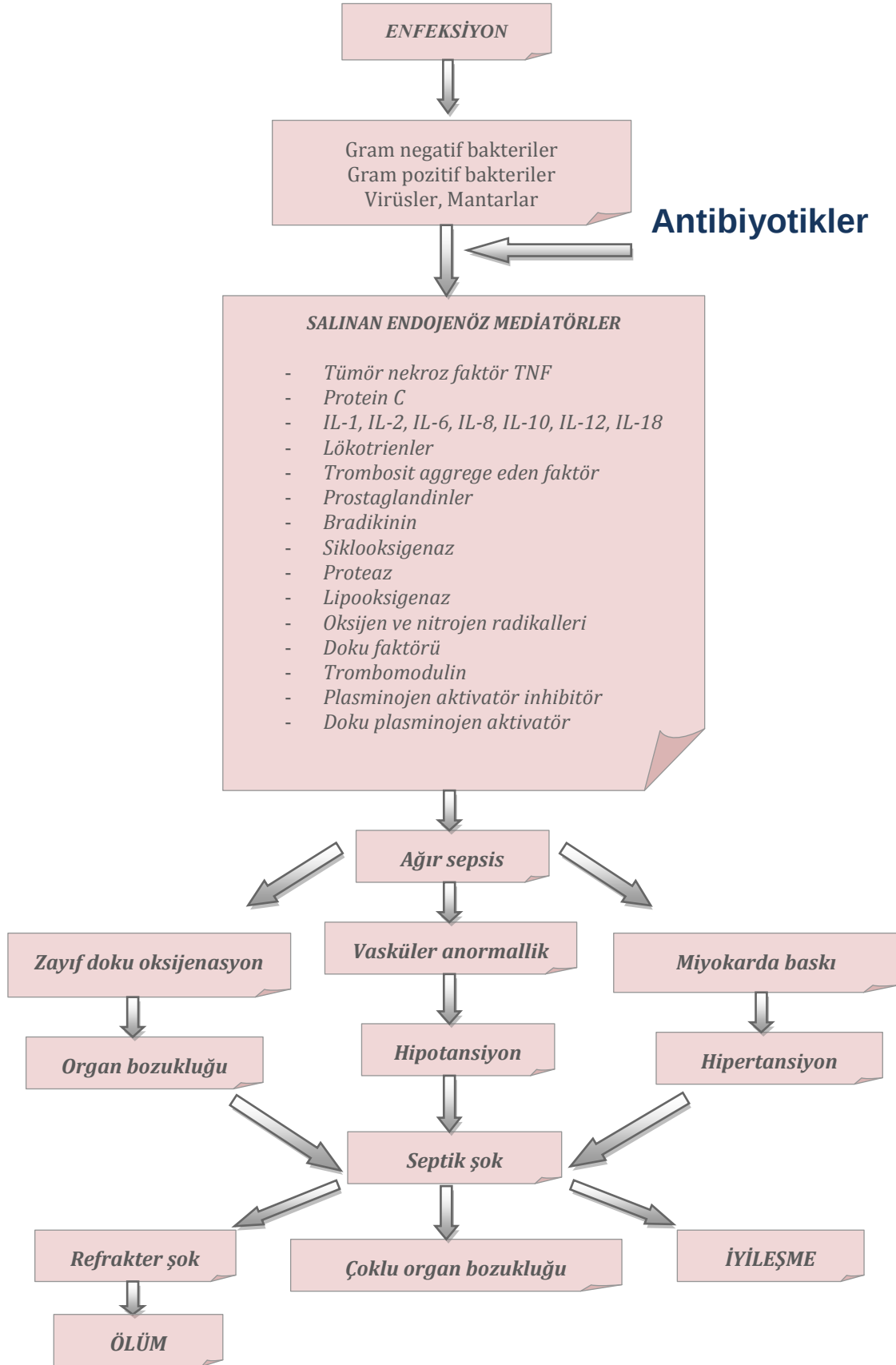
Hastane kaynaklı sepsislerde en sık izole edilen etkenler; *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar, *Enterococcus* türleri, *Escherichia coli* ve diğer barsak bakterileri, *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer nonfermantatif bakteriler, *Candida albicans* ve diğer *Candida* türleridir. Toplumda gelişen sepsislerde ise; *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* ve diğer barsak bakterileri en sık izole edilen bakterilerdir. Anaerob bakteriler ve mantarlar, toplumda gelişen sepsislerde az oranda etken olabilirler.²⁷

Farklı çalışmalarda, sepsislerin %20-64'ünde gram negatif bakterilerin etken olduğu, %27-74'ünde gram pozitif bakterilerin etken olduğu, %15 ve daha az oranda ise polimikrobiyal etken izole edildiği görülmüştür.^{14,27}

Mantarlardan *Candida* türleri, sepsis oluşturan etkenler arasında bakterilerden sonra izole edilen mikroorganizmalardır. Hastanede yatış süresi uzamış, geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, yoğun bakımda tutulan, nötropeni, diyabet gibi ek faktörlerin bulunduğu olgularda daha sık görülmektedir. Etkenler başta *C.albicans* olmak üzere, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. kefyr* olarak sıralanabilir. *Candida* dışında *Trichosporon* türleri de sepsis etkeni olarak izole edilmektedir. Küf mantarlarından başta *Aspergillus* türleri olmak üzere, zigomiçetler ve *Fusarium* türleri sepsis etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır.²⁸

2. 3. Sepsis Patogenezi

Sepsis mikroorganizma ile konağın immün, inflamatuvar ve koagülasyon cevaplarının etkileşiminin sonucudur. Konak cevapları ve enfekte eden organizmanın özellikleri (örneğin süperantijenlerin ve diğer virülans faktörlerinin varlığı, opsonizasyon ve fagositoza direnç ve antibiyotik direnci) sepsis gelişimini ve sepsisin sonucunu etkilemektedir.^{29,30,31,32}



Şekil 2.1: Sepsis Patogenezi.³³

2. 4. Doğal Bağışıklık

Konağın cevapları doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi cevapları olarak sınıflandırılabilir. Doğal bağışıklık, antijene özgü yanıt başlamadan önce mikroorganizmaların çoğalmasını ve yayılmasını önlemek üzere görev yapmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi monositler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler (NK), kompleman, akut faz proteinleri ve sitokinlerden oluşmaktadır.^{29,30,31}

Mikroorganizmalardaki “patojen ile ilişkili moleküler kalıplar” (PAMP) başta antijen sunan hücreler olmak üzere doğal bağışıklık sistemin içerisinde yer alan hücrelerin yüzeyinde bulunan “kalıp tanıma reseptörler” (PRRs) olarak adlandırılan reseptörler tarafından tanınmakta ve bağlanmaktadır.^{29,30,31,32,34}

Konak hücredeki PRR’ler birkaç reseptör ailesinden (örneğin ‘Toll-like reseptörler (TLR), kollajenöz lektinler) oluşmaktadır.²⁹ PAMP bu paterni tanıyan reseptöre bağlandığında bazı hücre içi sinyal yollarını aktive eder bu da transkripsiyon faktörlerinin (NF- κ B, AP-1) aktivasyonu ile sonuçlanır. Transkripsiyon faktörleri bağışıklık cevap genlerinin ekspresyonunu ve sonuçta sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri gibi çeşitli efektör moleküllerin salınımını ve/veya ekspresyonunu kontrol etmektedirler.^{30,31}

Aktive NF- κ B sitoplazmadan çekirdeğe giderek sitokinlerin transkripsiyonu başlatan bölgelere bağlanır, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interlökin-1 β (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve IL-10 gibi

antiinflatuar sitokinlerin transkripsiyonunu artırır. Sitokinler nötrofilleri, monositleri, makrofajları ve trombositleri endotel hücrelerine bağlanmak üzere aktive eder.^{29,30}

Bu efektör hücrelerden salınan proteazlar, oksidanlar, prostaglandinler ve lökotrienler gibi mediatörler endotel hücrelerinde hasara yol açarak vasküler geçirgenliğini artırır, proteinden zengin ödem sıvısının akciğerler ve diğer dokularda toplanmasına neden olurlar.^{29,30,32}

2. 5. Kazanılmış Bağışıklık

Mikroorganizmalar özgül hümmoral ve hücresele kazanılmış bağışıklık cevapları uyarak bağışıklık cevabını artırmaktadırlar. B hücrelerinin oluşturduğu immünglobülinler mikroorganizmalara bağlanarak antijen sunan hücreler tarafından bunların doğal öldürücü hücreler ve nötrofillere sunumunu kolaylaştırmaktadır.²⁹

Yardımcı (CD4+) T hücreleri tip 1 (Th1) ve tip 2 (Th2) hücreler olarak ikiye ayrılmaktadır. CD4+ T hücreleri aktive olduğunda inflammatuar veya antiinflatuar sitokinleri salgılamaya programlanmıştır. Th1 hücreleri TNF- α , IL-1 β , IFN γ ve IL-2 gibi proinflammatuar sitokinleri, Th2 hücreleri IL- 4 ve IL-10 gibi antiinflammatuar sitokinleri salgırlar. CD4+ T hücrelerin cevabının Th1 veya Th2 özelliğinde olmasını belirleyen faktörler bilinmemektedir.³¹ Ancak cevabın tipi enfekte eden organizmaya, bakteriyel inokulumun büyüklüğüne ve enfeksiyon bölgesine göre değişebilmektedir.^{29,32}

2. 6. Klinik Belirtiler ve Bulgular

Sepsis evresine göre klinik belirti ve bulgular değişmektedir. Klinik tablo bir evreden diğerine geçebilmektedir. Tablo 2. 2’de sepsiste en sık görülen klinik belirti ve bulgular görülmektedir. Bu belirti ve bulguları olan hastaların kan kültürü, varsa enfeksiyon odağından kültür örnekleri alınmalı ve uygun tedavi başlanmalıdır. Sepsisli hastaların büyük çoğunluğunda vücut ısısı yükselmekte, ateş ile beraber titreme de gözlenmektedir. Bazı hastalarda vücut ısısı normal sınırlarda olabileceği gibi, hipotermi de görülmektedir. Sepsise bağlı hipotermi, bebeklerde, ileri yaşlarda, üremi veya alkolizm gibi altta yatan kronik hastalığı olan hastalarda görülmektedir. Hipotermi sepsiste kötü prognozun bir işareti olarak yorumlanmaktadır. Nötropenik ve immün yetmezlikli hastalar sistemik enfeksiyona yatkındırlar. Bu hastalarda ateş görülmeden sepsis gelişebilmektedir. Hipotansiyon, oligüri, trombositopeni ve kanamanın gözlenmesi, bu hastaların sepsis yönünden değerlendirilmesini gerektirmektedir.^{35,36,37}

Tablo 2. 2: Sepsiste klinik belirtiler ve bulgular.

Belirti ve Bulgu	Komplikasyon
Ateş veya hipotermi	Hipotansiyon
Üşüme ve titreme	Kanama
Hiperventilasyon	Trombositopeni
Taşikardi	Lökopeni
Deri lezyonları	Organ yetersizliği:
Şuur değişikliği	Akciğer: ARDS Böbrek: Oligüri, anüri, asidoz Karaciğer: Sarılık Kalp: Konjestif yetmezlik

Hiperventilasyon, sepsisin en erken belirtisi olabilmektedir. Ateş, titreme ve diğer belirtiler daha sonra gelir. Yoğun bakım ünitelerinde devamlı takip edilen hastalarda hiperventilasyon ve respiratuvar alkaloz gözlenmesi, ilk planda sepsisi düşündürmelidir.^{37,38,39} Merkezi sinir sistemi tutulumu olmaksızın mental değişikliklerin olması sepsiste önemli bir bulgudur. Oryantasyon bozukluğu, konfüzyon, laterji, ajitasyon ve şuurda küntlük şeklinde klinik tablo ortaya çıkabilir.^{37,38}

2. 7. Sepsis Tanısı

Daha önceden sepsis tanısında enfeksiyonun mikrobiyolojik olarak kanıtlanması hatta bakteriyemi şartı aranmakta idi. Günümüzde sepsis tanısı için mikrobiyolojik kanıt gerekli değildir. Mikrobiyolojik bulguların klinik bulgularla eş zamanlı olarak ortaya çıkmadığı ve kültür sonucunun beklenmesinin önemli zaman kaybına neden olduğu, ve esasen çeşitli nedenlerle çok sayıda olguda mikrobiyolojik kanıta ulaşamadığı anlaşılmıştır. Ancak, sepsis hastalarında mikrobiyolojik tanı birçok yönden önem taşımaktadır ve vazgeçilmezdir. Erken başlanan uygun antibiyotik tedavisi hastalığın seyrini olumlu etkileyen en temel kriterlerden birisidir. Daha sonra etkenlerin saptanması lokal epidemiyolojik bilgilerin ortaya konulmasında, enfeksiyon kontrol önlemlerinin oluşturulmasında, ampirik tedavilerin uygun seçiminde çok önemli katkılar sağlamaktadır. Son yıllarda çok daha iyi anlaşıldığı üzere sepsis süreci dinamik bir süreçtir ve hastalık sürecinde etkenler değişebilmekte, tabloya yol açan yeni etkenler ortaya çıkabilmektedir. Etkenleri bilmek daha farklı tedavi olanaklarının kullanılmasını sağlayabilecektir.^{40,41,42,43}

Sepsis tanısı iki başlık altında incelenmektedir:

2.7.1. Sepsis ayırıcı tanısında kullanılan testler

Sepsis tanımı oldukça karmaşıktır. Sepsis kliniği ile çok sayıda klinik tablo karışabilmektedir. Pankreatit, politravmalar, yanık, pulmoner emboli, miyokard enfarktüsü, venöz tromboz, tiroid krizi, akut adrenal yetmezlik, organ reddi, kan ürünleri ile tedavi, sitokin uygulamaları, malign hipertermi, tümör lizis sendromu, subaraknoid kanama sepsis ile karışabilecek tabloların başlıcalarıdır. Nötrofil yanıtı ayırıcı tanıda kullanılmaktadır. Nötrofillerin sadece sayımı değil, periferik yaymada sola kayma bulgusunun aranması da önerilmelidir. Sitokinlerin (özellikle IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8) ve bunlarla ilişkili reseptörlerin artışı ile sepsis arasında ilişki tam olarak kurulamamış ve bu sitokinlerin sepsis dışı birçok hastalıkta ciddi olarak arttığı belirlenmiştir.^{42,43}

Meningokoksemi gibi bazı sepsis formlarında TNF- α düzeyleri yüksek ve mortalite ile ilişkili bulunmasına karşın sitokin yanıtının dalgalanan bir süreci olduğu ve bazı sepsis formlarında ölçülemeyecek seviyelerde sitokin yanıtı olduğu gözlenmiştir.^{44,45}

CRP, başlıca karaciğerde sentezlenen, IL-6, IL-1B ve TNF- α uyarısıyla salgılanan, özellikle bakteri eradikasyonunda çok önemli işlev gören bir akut faz proteinidir. Uyarı sonrası ortalama dört-altı saat sonra salgılanmaya başlamakta ve 36-50 saatte en üst düzeye ulaşmaktadır. Sepsis tanısında CRP sınır değeri olarak 50-100 mg/L üzeri kullanılmış fakat kesin bir sınır-değer tanımlanmamıştır. Sepsis tanısında duyarlılık

%68-98.5 arasında, özgüllük %40-78 arasında bulunmuştur. Tek bir ölçümle sepsis tanısı konulmasının güvenilir bir parametre olmadığı ve sepsis prognozu konusunda da yeterli bilgi vermediği sonucuna varılmıştır. Geç dönemde artması nedeniyle sepsis gibi çok dinamik bir süreçte faydalı olmayacağı, sepsis dışı bir çok nedende yükselebilmesi (travma, yanık, cerrahi) nedeniyle özellikle YBÜ hastalarında sepsis tanı testi olarak kullanılamayacağı sonucuna ulaşılmıştır.^{46,47}

Prokalsitonin (PKT), normalde tiroid C hücrelerinden salgılanan kalsitoninin propeptididir. Normalde plazmada 5-50 pg/ml gibi çok düşük miktarlarda bulunur. Bakteriyel lipopolisakkarid uyarısı ile mononükleer hücrelerden ve TNF- α , IL-6 uyarısı ile karaciğer hücrelerinden sentezlendiği sanılmaktadır. Uyarıdan üç-dört saat sonra artış başlar ve pik değere yaklaşık altı saatte ulaşır. Yarılanma ömrü, 25-30 saattir. Böbrek yetmezliğinde bu süre %30 kadar uzamaktadır. Viral enfeksiyonlar, inflamatuvar olaylar ve lokalize bakteriyel enfeksiyonlar hafif artışa yol açarken sistemik bakteriyel enfeksiyonda artmaktadır. Sepsis için tanı koydurucu sınır değer tam olarak oluşturulamamıştır. Hasta grupları ve sınır değer farklılıklarından dolayı yapılan çalışmalarda sepsis tanısında PKT duyarlılığı %65-97, özgüllüğü %48-94 arasında bulunmuştur.^{46,47} PKT>2 ng/ml üzeri değerlerinin ağır sepsis, >11.6 ng/ml değerlerin septik şok tanımında kullanılabileceği belirtilmiştir.⁴⁸ Yoğun bakımda, yenidoğan sepsisinde başarılı olduğu düşünülmektedir.⁴⁹

Birçok çalışmada CRP ve PKT kıyaslandığında genelde PKT sepsis tanısı ve enfeksiyon kaynaklı olmayan SİYS ile sepsis ayırımında daha başarılı bulunsa da bu konu tartışmalıdır. Sepsisin ağırlığı ve prognozunu göstermek açısından PKT daha başarılı bir parametre olarak tanımlanmıştır. Simon ve arkadaşları yaptıkları metaanaliz sonucunda,

hastaneye yatırılan hastalarda bakteriyel enfeksiyonların tanısında PKT seviyesi ölçümünü CRP ölçümüne kıyasla daha başarılı bulmuşlardır.⁵⁰

Endotoksin, gram negatif bakteri hücre duvarının lipopolisakkarid (LPS) yapısındaki hücre duvar yapısı olup mononükleer hücrelerin uyarısı ile sepsis oluşumunda temel uyaran olarak görev yapmaktadır. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin de endotoksin salınımını uyardıkları saptanmıştır.⁵¹ Limulus lizat testi ile endotoksin ölçümü, gram negatif bakteriyemi ve sepsislerde denenmiş tanısal değerinin düşük olduğu gösterilmiştir.⁵²

Neopterin, monosit-makrofaj sistemi uyarısını gösteren bir göstergedir. Viral enfeksiyonların gösterilmesinde, HIV enfeksiyonunun ilerleyişinde, ayrıca malignitelerde (özellikle multiple miyelom), aktivasyon göstergesi olarak, kalp yetmezliği, organ-reddi, koroner arter hastalığında faydalı bir test olarak saptanmış ve sepsis olgularında prognoz yönünden fikir verici olabileceği belirtilmiştir.⁵³

Sepsis tanısı ya da sepsisin öngörülmesi konusunda yeni bir kavram olan PIRO evrelendirmesinde, yatkınlık (P: Predisposition) kavramı ele alınabilmektedir. Yatkınlık; altta yatan faktörler (alkol kullanımı, arterioskleroz, vb.) yanında genetik faktörlerle de ilişkili bulunmuş ve bazı genetik özelliklerin (Toll-like reseptör genleri gibi) sepsise yatkınlık yönünden araştırılması gündeme gelmiştir.^{54,55}

2.7.2. Sepsis etkenini tanımlayıcı testler

Sepsis tanısı konulduğunda ikinci önemli adım odağın ve etkenin gösterilmesidir. Klasik mikrobiyolojik yöntemler bazı sorunları çözümlenmede yetersiz kalmaktadır. Kolonizasyon-enfeksiyon ayrımı, flora bakterilerinin steril bölgede üretilmesinin yorumu, polimikrobiyal üremede izlenecek yol belirlenmiş değildir. Etken tanımında sorunlar yaşanmaktadır. Asıl önemli sorun ise özellikle son 48 saatte başlanan antibiyotik tedavisinin kültür sonuçlarını etkilemesidir. Odağı belirlemek için sistemik muayene en temel yol göstericidir. Bu inceleme sürecinde cerrahi ve diğer yaralar (dekübit) mutlaka gözden geçirilmeli, kateter giriş yeri ve ekstremiteler incelenmeli ve flebit, selülit gibi enfeksiyonlar saptanmalıdır. Sinüzit akla gelmeli, göz dibi özellikle *Candida* sepsisi sürecinde saptanan endoftalmi yönünden değerlendirilmelidir. İshal varlığında *Clostridium difficile*, pürülan idrar varlığında (sondalı hastalarda ayırım çok zor olsa da) üriner enfeksiyon akla getirilmelidir. Tüm bu değerlendirmeler tamamlanınca mutlaka en az iki adet kan kültürü ve odak olarak belirlenen bölgelerden kültür örneği alınmalıdır. Laboratuvar ile iletişim sağlanmalı, özel etkenler yönünden inceleme gerekliliğinde laboratuvara iletilmeli ve laboratuvar pozitif sonuçları en kısa sürede kliniğe bildirilmelidir. Gram preparatı uygun antibiyotik tedavisinde temel yol gösterici olarak kullanılmalıdır.^{42,43,56,57}

Sepsis şüphesi olan her hastada kan kültürü alınmalıdır. Kan kültürü ateş ve titreme döneminde mümkün olduğunca çabuk ve mutlaka antibiyoterapi öncesinde alınmalıdır. En az iki şişe alınması önemlidir. Kateter varlığında kateter ve periferden eş zamanlı olarak alınarak laboratuvara gönderilmeli ve alınış yerleri şişelerde belirtilmelidir. Kateter yok ise 15-30 dakika arayla alınan iki kan kültürü ya da aynı anda farklı

venlerden alınan kan kültürü kullanılabilir. Endokardit olasılığı varsa ya da nadir patojenler düşünülüyorsa 6-8 şişe alınması önerilir. Rutin olarak daha fazla kan alınması önerilmez.⁵⁸

Kan kültürlerinde kontaminasyon çok ciddi bir sorundur. Ortalama %3-5 arasında kontaminasyon oranları bildirilmektedir. Kontaminasyon, etkeni yanlış tanımlamaya yol açabileceği gibi, yanlış bakteriyemi tanısına ve buna bağlı gereksiz antibiyotik kullanımına, yatış süresinde uzamaya ve ciddi maliyet artışına neden olmaktadır.⁴³

Hastanelerde en sık sepsise neden olan yabancı cisim santral venöz kateterlerdir. Kateter kaynaklı enfeksiyonu tanımlamak için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Kateter ve periferden kantitatif kan kültürü yapmak, giriş yerinden sürüntü / apse örneği kültürü, çıkarılan kateterin boyanarak incelenmesi, kateter içinden fırçalama yöntemi ile örnek alarak çalışılması kullanılabilecek bazı yöntemlerdir. Fakat günümüzde en sık kullanılan yöntem, çıkarılan kateter parçasının petri plağındaki besiyerinde dört-beş kez yuvarlanması ile ekim yapılmasıdır. Üreyen koloni sayısı (15 ve daha fazla koloni anlamlı) ile tanı konulmasını öneren Maki yöntemi ve lümen içinden sıvı geçirerek sonikasyon ya da vorteksleme sonrası ekimi öngören kantitatif kateter kültürü $\leq 10^{2-3}$ koloni anlamlı) en sık kullanılan yöntemler olmuştur. Fakat son yıllarda kateter çıkarılmadan kateter kaynaklı bakteriyemi tanısında faydalı olabilecek sistemler ön plana geçmiştir.^{59,60}

2. 8. Sepsis Prognozu

Sepsis tedavisinde yeni gelişmelere rağmen ölüm oranı hala yüksektir. Değişik çalışmalarda ölüm oranı %20-80 arasında bildirilmektedir.^{3,27} Gram negatif bakteriyel sepsislerde ölüm oranı %45-50,^{14,25,26,39,61} gram pozitif bakteriyel sepsislerde %20-30,^{24,62} ve anaerop sepsislerde ise ölüm oranı %15-30'dur.⁶³ Şok, yaygın damar içi pıhtılaşma (DİK), Akut Solunum yetmezliği Sendromu (ARDS) ve diğer organ yetmezliği komplikasyonları geliştiğinde ölüm oranı %70-90 arasında değişmektedir.^{14,37,64} Etkenlere göre ölüm oranları da farklılık gösterir. En yüksek ölüm oranı *P.aeruginosa* sepsislerinde bildirilmektedir.^{14,37,65} Sepsis prognozunu Altta yatan hastalık (nötropeni, hipogammaglobulinemi, diabet, alkolizm, böbrek yetmezliği, solunum yetersizliği), tedavi başladığında enfeksiyona bağlı komplikasyonların gelişmiş olması (şok, anüri gibi), bakteriyeminin şiddeti (polimikrobiyal bakteriyemi), enfeksiyon kaynağı, enfeksiyonun geliştiği yer (nozokomial), hastanın yattığı servis (yoğun bakım ünitesi), antibiyotik tedavisinin uygunluğu, tedavinin başlanmasına kadar geçen zaman, ileri yaş gibi birçok faktör etkileyebilmektedir.^{14,37,65}

2. 9.Tedavi

Sepsis tedavisi üç ana başlık altında incelenmektedir.⁶⁶

2. 9. 1. Uygun antimikrobiyal tedavi

Sepsisin antimikrobiyal tedavisinde kullanılacak ajanlar, bakterisitik özellikte olmalı ve damar içi yoldan kullanılmalıdır. Ancak,

antimikrobiyal tedaviye başlamadan önce kültür için uygun örnekler alınmalıdır. Şüpheli kateter varsa çıkarılmalı ve semi kantitatif kültürü yapılmalıdır. Sepsis tablosunda antimikrobiyal tedaviye başlamak için kültür-antibiyoqram sonuçlarını beklemek zaman kaybına neden olacağından, en kısa sürede olası kaynağa göre ampirik olarak seçilecek bir ajan ile tedaviye başlanmalıdır.⁶⁶

Ampirik antimikrobiyal seçimi için değişik kaynaklarda çeşitli öneriler bulunmaktadır. Sepsisli hastalarda çeşitli faktörler göz önüne alınarak seçilebilecek olan ampirik antibiyotikler Tablo 2.3' de özetlenmiştir. Aslında her hekim; bulunduğu şartları, hastasına ait faktörleri ve çalıştığı bölgedeki/kurumdaki antimikrobiyal direnç durumlarını göz önünde tutarak ampirik antibiyotik tedavisine karar vermelidir.⁶⁶

Ayrıca, ampirik olarak hangi antimikrobiyal ajan seçilirse seçilsin, elde edilecek olan kültür ve antibiyoqram sonucuna göre tedavi yeniden düzenlenmelidir. Sorumlu etken saptandıktan sonraki dönemde, belirli bazı endikasyonlar haricinde kombine tedavinin monoterapiye üstünlüğü gösterilmemiştir.⁶⁶

Mantarlar ile oluşan bir sepsis söz konusu ise antifungal tedavi başlanmalıdır. Antibakteriyel tedaviye rağmen, ateşin yedi günde düşmemesi ve enfeksiyon kaynağının saptanamaması halinde, hastalara ampirik olarak antifungal tedavi başlanması gerekebilir.⁶⁶

Garey ve arkadaşları yaptığı çalışmada, kandidemi tanısı konulan hastalarda *Candida*'nın kültürde saptanması ile flukonazol başlanması arasında geçen süre saptanarak bu sürenin ölüm oranına etkisi araştırmışlardır. Kültür pozitifliğinin saptandığı sıfırıncı günde tedaviye başlanan hastalarda ölüm oranına %15, birinci günde tedaviye başlananlarda %24, ikinci günde tedaviye başlananlarda %37, daha sonra başlananlarda ise %41 olarak bulunmuştur.⁶⁶

Tablo 2. 3: Sepsisli hastalarda ampirik antibiyotik seçenekleri

	Akciğer	Karın	Kaynak Deri- yumuşak doku	Üriner sistem	Meninksler
Toplum kökenli etkenler	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Legionella</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>E.coli</i> <i>Bacteriodes fragilis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>polimikrobiyal</i>	Klebsiella türleri <i>E.coli</i> Enterobacter türleri Proteus türleri Enterokoklar	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Listeria</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
Seçenekler	Moksifloksasin veya gatifloksasin veya azitromisin + sefotaksim veya seftazidim	İmipenem-silastatin veya meropenem veya Pip-Tazo ± AG*	Vankomisin + imipenem veya meropenem veya Pip-Tazo	Siprofloksasin veya levofloksasin	Vankomisin + seftriakson veya sefepim
Hastane kökenli etkenler	Aerop gram-negatif basiller	Aerop gram-negatif basiller Anaeroplara <i>Candida</i> türleri	<i>S. aureus</i> (<i>MRSA</i>) Aerop gram-negatif basiller	Aerop gram-negatif basiller Enterokoklar	Aerop gram-negatif basiller Stafilokoklar
Seçenekler	İmipenem-silastatin veya meropenem veya sefepim	İmipenem veya meropenem veya Pip-Tazo ± AG	Vankomisin + sefepim	Vankomisin + sefepim	Vankomisin + Sefepim

*: Pip-Tazo: Piperasillin- tazobaktam , AG: Aminoglikozid

2. 9. 2. Çok yönlü destek tedavisi

2. 9. 2. a. Başlangıç resüsitasyonu

Sepsis tanısı konulduktan sonra ilk altı saat içinde santral venöz basıncın 8-12 mmHg'da, ortalama arteriyel basıncın 65 mmHg veya üzerinde tutulması, idrar miktarının 0.5 m/kg/saat veya üzerinde tutulması, santral venöz (süperior vena kava) ya da mikst venöz oksijen satürasyonunun %70 veya üzerinde tutulması için kristalloid ya da kolloid replasmanı yapılmaktadır. Hastanın kan değerleri gözden geçirilerek gerekirse Hct $\geq$ %30 olacak şekilde eritrosit süspansiyonu verilmesi ve/veya dobutamin infüzyonu yapılması gerekebilir (maksimum doz: 20 µg/kg/dakika).⁶⁶

2. 9. 2. b. Sıvı tedavisi

Başlangıç resüsitasyonunu takiben hasta monitörize edildikten sonra, sıvı tedavisi her hastada devam ettirilmelidir. Sıvı tedavisinde kristalloidler veya kolloidler kullanılabilir.⁶⁶

2. 9. 2. c. Kan ürünü aktarımı

Sepsisli hastalarda pıhtılaşma faktörlerinin eksikliği halinde artmış protrombin zamanı [International Normalized Ratio (INR)] veya artmış parsiyel tromboplastin zamanı, tabloya aktif kanama da eklenmişse

veya invaziv girişim planlanıyor ise; taze donmuş plazma transfüzyonu önerilmektedir.⁶⁶

Sepsisli hastalarda antitrombin kullanımı önerilmemektedir. Faz III çalışmalarda sağkalım üzerine olumlu etkisi gösterilememiştir. Üstelik, heparin ile birlikte yüksek dozda kullanıldığında, kanama riskini de arttırmaktadır. Sepsisli hastalarda trombosit sayısı 5000/mm³ altında ise, trombosit süspansiyonu transfüzyonu yapılmalıdır. Fibrinojen değeri 50 mg/dL altında ise veya aktif kanama var ve fibrinojen 100 mg/dL altında ise kriyopresipitat verilmelidir. Nötrofil sayısının 100'ün altına inmesi halinde G-CSF ve GM-CSF uygulanabilir. Poliklonal immünglobulin kullanımı ile ilgili yapılmış olan geniş kapsamlı çalışmalarda sepsise bağlı ölüm ve septik şok gelişimi oranlarında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu yüzden, sepsisli hastalarda poliklonal immünglobulin kullanımı önerilmemektedir.⁶⁶

2. 9. 2. d. Vazopresörler

Sepsisli hastaların hemodinamik desteği için uygun ve yeterli sıvı tedavisi temel yaklaşımdır. Ancak, septik şoktaki hastaların bir kısmında yeterli sıvı tedavisine rağmen yeterli kan basıncı ve organ perfüzyonu sağlanamayabilir. Bu durumda vazopresör ajanlara gereksinim duyulur. Uygun sıvı tedavisine rağmen ortalama arteryel basınç 70 mmHg'nın altında ise vazopresör kullanılmalıdır. Noradrenalin ya da dopamin, ilk tercih edilen vazopresör ilaçlardır. Yeterli desteğe rağmen kardiyak "output" istenilen düzeye erişemez ise, inotropik olarak dobutamin kullanılabilir. Kan basıncı düşüklüğü halinde dobutamin ile vazopresör tedavi kombine edilmelidir.⁶⁶

2. 9. 2. e. Sepsis kaynağının kontrolü

Sepsis tablosundaki her hasta enfeksiyon odağı açısından da değerlendirilmeli, gerekirse bu yönde konsültasyonlar alınmalıdır. Bu amaçla; apse oluşumları, nekrotik dokular, fistüller, hasta vücuduna yerleştirilmiş olan her türlü aparat sepsis kaynağı olmaları açısından kontrol edilmeli ve saptanan tüm riskler ortadan kaldırılmalıdır.⁶⁶

2. 9. 2. f. Steroid kullanımı

Sepsisli hastalarda adrenal yetersizlik gelişebilir. La Rosa'nın derlemesinde sepsiste kısa süreli yüksek doz kortikosteroid tedavisinin faydalı olmadığı, fakat uzun süre düşük doz kortikosteroid kullanımının vazopresör bağımlı septik şokta faydalı olduğu rapor edilmiştir.⁶⁶

2. 9. 2. g. Aktive protein C (rhAPC) kullanımı

Çoklu organ yetmezliği gelişmiş, septik şok veya sepsise bağlı solunumsal distres sendromu gelişmiş veya "Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II)" skoru 25'in üzerinde olan yüksek riskli hastalarda; kanama riskine bağlı kontrendikasyon yok ise, rhAPC kullanımı önerilir.⁶⁶

2. 9. 2. h. Kan glikozunun kontrolü

Başlangıç resüsitasyonu sağlandıktan sonra, kan glikoz düzeyi mutlaka 150 mg/dL'nin altında tutulmalıdır. Bu amaçla gerekirse yoğun insülin tedavisi uygulanmalı ancak, hipoglisemi riski nedeniyle kan glikoz düzeyinin sıkı bir şekilde takibi ihmal edilmemelidir.⁶⁶

2. 9. 2. i. Stres ülseri profilaksisi

Stres ülseri profilaksisi tüm sepsisli hastalarda uygulanmalıdır. Profilaksi H₂ reseptör blokerleri veya sükralfat ile yapılabilir, fakat H₂ reseptör blokerleri daha etkili bulunmuştur. Etkinliği karşılaştırmalı çalışmalarla tayin edilmemiş olmakla birlikte, proton pompa inhibitörleri de kullanılabilir.⁶⁶

2. 9. 2. j. Derin ven trombozu profilaksisi

Sepsisli hastalara, heparin ile derin ven trombozu profilaksisi uygulanabilir. Heparinin kontrendike olduğu hallerde (trombositopeni, ciddi koagulopati, yakın zamanda kafa içi kanama hikayesi, halen aktif kanama bulunması vs.) mekanik profilaksi uygulanır. Bu amaçla varis çorapları kullanılabilir.⁶⁶

2. 9. 3. Sepsiste deneysel tedaviler

1. Ketokonazol: Tromboksan sentetaz inhibitörü olan ketokonazolün ilk 24 saatte verildiği takdirde ARDS insidansı ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir.^{68,69,70}

2. Anti-TNF: TNF etkisini çeşitli yollarla engellemek amaçlanmıştır. Birinci yol TNF salınımını engellemektir. Bu konuda pentoksifilin ile ilgili çalışmalar vardır, erken dönemde kullanımına bağlı olarak TNF düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. İkinci yol Anti-TNF monoklonal antikorlarının kullanılmasıdır. Doza bağımlı olarak TNF düzeylerinde azalma sağlanmış, 28 günlük mortalitede fark saptanmamasına rağmen organ yetmezliği gelişiminde belirgin azalma gözlenmiştir. Üçüncü yol ise Anti-TNF reseptörleridir. Yüksek dozlarda mortaliteyi arttırdıkları görülmüş, bu etkinin uzamış TNF ekspozisyonuna bağlı TNF ve reseptörler arasındaki bağın zayıflaması ile olduğu açıklanmıştır.⁷⁰

3. Anti IL-1: IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra), IL-1'in reseptör membranına bağlanmasını inhibe eder. Doza bağımlı olarak mortalitede azalma görülmüş ancak daha sonra yapılan çalışmalarda olumlu sonuç alınamamıştır.⁷¹

4. Anti-PAF: Platelet aktivatör faktör (PAF) antagonistleri ile mortalitede fark gözlenmemiştir. Ancak, prostaglandin E'nin sağkalıma katkısı olmasa da, oksijenlenmeyi arttırdığı, ventilatör bağımlılığını azalttığı gösterilmiştir.⁷⁰

5. Antioksidan tedaviler: SOD infüzyonu ile farelerde endotoksin etkilerine karşı korunma sağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca N-Asetil sisteinin antioksidan etkisinden yola çıkılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır.⁷²

6. Surfaktan: ARDS'de doğal surfaktanın mortaliteyi doza bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir.⁷²

7. NO: Solunan NO pulmoner damarlarda selektif dilatasyona neden olur, sağ ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu artırır ve sağ ventrikül diastol sonu volümünü azaltır.⁷²

8. IL-8, IL-6, Doku faktörü antikorları ile ilgili hayvan çalışmaları devam etmektedir, henüz insanlar üzerinde denenmemiştir.⁷²

2. 10. Sepsis Etkenlerinin Moleküller Yöntemlerle

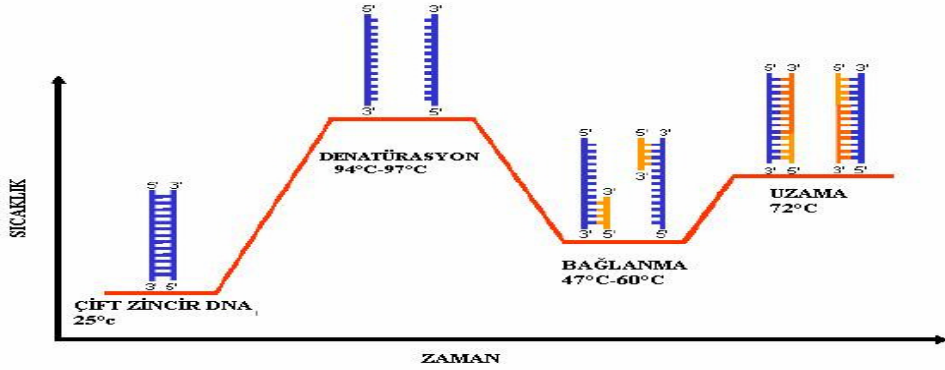
Tanımlanması

Kültür her ne kadar mikroorganizma tanısında altın standart olarak önemini korumaya devam etse de, dezavantajlardan dolayı nükleik asit saptanmasına dayalı yeni tanı yöntemleri gündeme gelmiştir. Nükleik asit saptanması için en çok kullanılan yöntem, hedeflenen gen bölgesinin çoğaltılıp görüntülenmesine dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'dur.⁷³

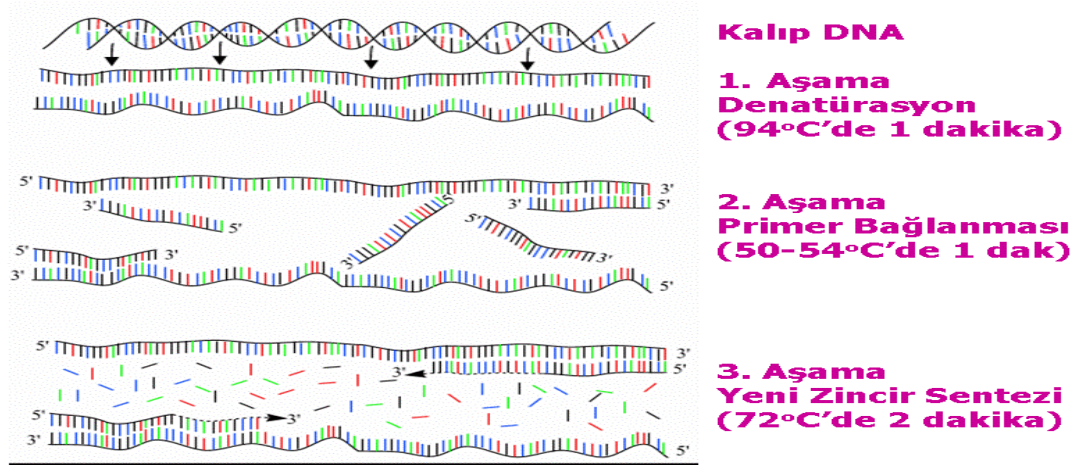
1980 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmış olan PZR tekniği moleküler araştırmaların yapılmasında büyük kolaylıklar sağlamış ve günümüzdeki PZR çalışmalarının temelini atmıştır⁷⁴. PZR, özgül

primerler aracılığı ile, bir DNA parçasının çoğaltılmasına dayanan *in vitro* bir yöntemdir. Bu reaksiyonda temel olarak çoğaltılması planlanan hedef bölgenin iki ucundaki DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp, karşı iplikçiklerini hibridize eden iki oligonükleotid primer, primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentez için gerekli olan deoksinükleosid trifosfatlar (dNTP), polimerazın çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve kofaktör olan Mg^{+2} iyonları kullanılmaktadır.⁷⁵

PZR 'da reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA içeren örnek, çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra, yüksek ısı ile örnekteki hedef çift sarmal DNA'nın tek sarmal DNA'ya dönüşmesi sağlanır. Bu basamak denatürasyon adını alır. Tek DNA iplikçiklerinin karşıtı, 20-30 baz çifti (bç) uzunluğundaki sentetik oligonükleotid diziler, DNA/RNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacı ile ikinci bir primer kullanılır. Primerlerden birisi, ssDNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerindeki sonlandırıcı bölgeye bağlanır. Bu aşama ise bağlanma (annealing) aşamasıdır. Taq DNA polimeraz enziminin yardımı ile, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her ssDNA zincirinin komplementeri oluşturulur. Bu aşama da uzama (extention) aşamasıdır. Bu aşamaların sonunda iki adet dsDNA oluşur. Oluşan dsDNA 'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenir. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığı zaman, birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir.⁷⁶



Şekil 2.2: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) basamakları ⁷⁶



Şekil 2.3: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ⁷⁶

Gerçek zamanlı (Real Time) PZR ise, reaksiyon boyunca veri toplanması ve analizin aynı anda devam etmesi demektir. Yani bu reaksiyonda amplifikasyon ve analiz birlikte yapılmaktadır. DNA boyaları

ya da floresan probalar gibi analiz için gerekli olan reaktifler, PZR karışımına amplifikasyondan önce eklenmektedir. Veriler amplifikasyon süresince aynı tüp içinden ve aynı cihaz ile toplanmaktadır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayırımı yoktur. Bu reaksiyon ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde diziye özgül olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanıldığı için, sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azaltılmaktadır. Miktar tayini ise örnekteki özgül sekansın saf miktarı ölçülerek yapılmaktadır.⁷⁷

Gerçek zamanlı PZR kimyası amplifikasyonun, reaksiyonun erken fazlarında ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Reaksiyonun kinetiklerini PZR' nin erken fazlarında ölçebilmek, geleneksel PZR' a kıyasla kesin bir avantaj sağlamaktadır.⁷⁷

Geleneksel PZR yöntemlerinde amplifikasyonu tanımlamak için agaroz jeller kullanılmaktadır. Agaroz jelde sonuçlar, reaksiyonun bitiş noktasında elde edilmektedir. Bitiş noktasının belirlenmesi ise çok zaman almaktadır. Günlerce sonuç elde edilemeyebilir. Ortaya çıkan sonuçlar tam, kusursuz değildir. Çünkü bitiş noktaları örnekten örneğe çeşitlilik göstermektedir. Jellerin çözümleyemediği bu çeşitliliği gerçek zamanlı PZR tanımlayabilir.⁷⁷

Gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR);

- Bilgileri eksponensiyel büyüme fazında topladığından,
- Floresan sinyallerde artış, üretilen amplikonların miktarı ile doğru orantılı olduğundan,
- Prob bir amplikonun sürekli amplifikasyonunu sağladığından,

- Geniş tanımlama aralığı olduğundan,
- PZR işlemlerine gerek duyulmadığından geleneksel PZR yöntemlerine oranla daha avantajlı bir yöntemdir.⁷⁷

2. 11. DNA Boyaları Kullanılarak Gerçek Zamanlı PZR

Çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan boyalar ile uygulanmaktadır. Özgül olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında en çok "SYBR green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından, çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak gerçek zamanlı PZR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. "SYBR green I" en fazla kullanılan boya çeşididir, 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya, 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin %6'sını kaybeder. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir. Bu yöntem optimize edilmiş PZR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problara ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PZR ürünlerinin çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından, her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez, yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında, primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer

dimer”leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışıma gözlenebilir. Çoğaltılan DNA’nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA’ların erime eğrisi analizlerinin (Melting curve) yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde, cihaz PZR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA’nın belirli bir erime sıcaklığı (' T_m ' derecesi) vardır. Bu erime sıcaklığı, çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer’lerinde) aranan DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olacaktır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindendir. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir.⁷⁸

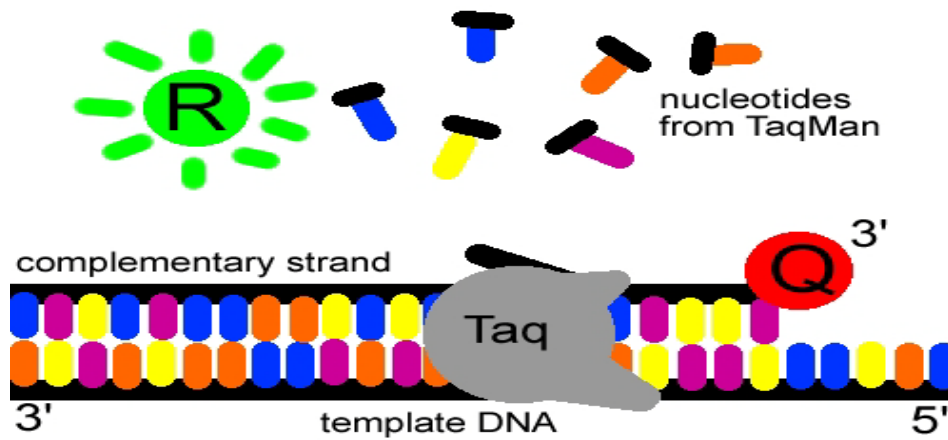
2. 12. Özgül Problar Kullanılarak Gerçek Zamanlı PZR

Hedefe özgül problar ile testin özgüllüğü artırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli donör boya (donor dye), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlenmiştir. Problar hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır.⁷⁹

“Fluoresance resonance energy transfer, (FRET)” olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı,

ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğerk bir ifade ile PZR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağılı olarak artmaktadır.⁷⁹

TaqMan sisteminde ise 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli tek bir prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır.⁷⁹



Şekil 2. 4: TaqMan Sistemi⁷⁹

2. 13. Çok Hedefli (Mltipleks) PZR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknolojisinin bir versiyonu olan çok hedefli PZR yöntemi, birçok enfeksiyonun tanısında kullanılmaya başlanmıştır.⁸⁰ 1988'de Chamberlian ve ark. tarafından tanımlanan çok hedefli PZR delesyonları, mutasyonları ve polimorfizmleri içeren birçok DNA analizlerinde uygulanmıştır.⁸¹

Bu yöntemle; amplifikasyon tüpü içerisine klinik örnekte bulunabilecek her mikroorganizma için özgül olan birden fazla primer konarak çoklu sonuç elde edilmektedir. Ayrıca, bakteri ya da mantar geni üzerindeki farklı hedef bölgeler için özgül olan primerler kullanarak, çok sayıda hedef aynı zamanda oğaltabilmektedir. Her bir primer çiftine özgül, farklı büyüklükteki amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde gözlenmesi ile klinik örnekte mikroorganizmaların varlığı ve tanımı aynı anda yapılabilir.^{80,82}

Çok hedefli (mültipleks) PZR yöntemi önemli derecede optimizasyona gerek duymaktadır. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, bağlanma ısılarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartları gerçekleştirilmesi gereklidir. Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve belirli olmayan amplifikasyonların önlenmesi için birçok deneme gerekmektedir.⁷⁹

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3. 1. 1. Cihazlar

Etüv (elektro-mag, Türkiye)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, ABD)

LightCycler® 2.0 (Roche, Almanya)

Mikropipetler ve uçları (Expell, Meksika- Beta Pette™, ABD)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye)

Santrifüj cihazı (BOECO, Almanya)

Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Almanya)

Kuru blok (Bio TDB-100, Almanya)

Cam eşyalar, özeler, bistüriler, kapillerler, enjektör

BacT/ALERT® 3D (BioMerieux, ABD)

Mikropipetler ve uçları (Beta pette™ , ABD)

Hayvan modelleri (Tavşan, GÜDAM)

3. 1. 2. Kimyasallar

Tavşan anestezisi için ksilazin %2 (Alfasan International B. V. Hollanda)

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Fluka Biochemica, İsviçre)

Kanlı agar besiyeri (Oxoid, England)

Fenol (Sigma, Almanya)

Kloroform (Kimetsan, Türkiye)

İzoamilalkol (Merck, Almanya)

Saf etanol (Rirdel, Almanya)

EDTA (Fluka Biochemica, İsviçre)

Sodyum klorid (Sigma, Almanya)

TRİS ($C_4H_{11}NO_3$) 1KG (Amresco®, Kanada)

Magnezyum klorid çözeltisi ($MgCl_2$) (AppliChem, Almanya)

Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) (AppliChem, Almanya)

Sodyum klorür solüsyonu (Eczacıbaşı-Baxter H.Ü, Türkiye)

Agar (Himedia, Hindistan)

Pediyatrik kan şişeleri (BioMerieux, ABD)

3. 1. 3. Kullanılan kitler

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (ROCHE, Almanya)

Heliosis kiti (Metis, Türkiye)

3. 1. 4. Kullanılan primerler ve enzimler

Bakteri primerleri (Eurogentec, Belçika)

Mantar primerleri (Metabion, Almanya)

LightCycler® DNA Master SYBR green I (ROCHE, Almanya)

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (ROCHE, Almanya)

3. 1. 5. Besiyerleri

3. 1. 5. a. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) Besiyeri (pH =5.6)

1 litre SDA için:	SDA toz	47 g
	Agar	5 g
	Distile su	1 L

121°C' de 15 dk otoklavda sterilize edilmiş, sonra petri plaklarına dağıtılıp, oda ısısında katılaşmaya bırakılmıştır.

3. 1. 5. b. Kanlı agar besiyeri (pH =7.3)

1 litre kanlı agar için:	Kanlı agar toz	40 g
	Agar	5 g

121°C' de 15 dk otoklavda sterilize edilmiş, sonra 45-50°C'ye soğutulmuştur, üzerine %5-7 defibrine koyun kanı eklenmiştir. Daha sonra petri plaklarına dağıtılıp, oda ısısında katılaşmaya bırakılmıştır.

3. 1. 6. Mikroorganizma süspansiyonları

3. 1. 6. a. Kullanılan mikroorganizma süspansiyonları

- i. Mantar Süspansiyonu.
- ii. Bakteri Süspansiyonu.
- iii. Mantar ve Bakteri Süspansiyonu.

3. 1. 6. b. Kullanılan mikroorganizma süspansiyonların hazırlanması

3. 1. 6. b. i. Mantar solüsyonları

500 µL SF içerisinde 1 McFarland yoğunlukta (10^6 CFU/ml) *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* solüsyonları hazırlanmıştır.

3. 1. 6. b. ii. Bakteri solüsyonları

500 µL SF içerisinde 1 McFarland yoğunlukta (10^8 CFU/ml) *E.coli* ve *S.aureus* solüsyonları hazırlanmıştır.

3. 1. 6. b. iii. Mantar ve bakteri süspansiyonu

Yukarıda hazırlanan bakteri ve mantar solüsyonları karıştırılarak hazırlanmıştır.

3. 1. 7. Ekstraksiyon ortamında kullanılan solüsyonlarının hazırlanması

3. 1. 7. a. 100 ml Fenol-kloroform-izoamil alkol (25: 24: 1) hazırlanması

50 ml fenol: 24 ml kloroform: 1 ml izoamil alkol karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlandıktan sonra kap sıkı bir şekilde kapatılmıştır ve +4°C de saklanmıştır.

3. 1. 7. b. 100 ml kloroform-izoamil alkol (24: 1) hazırlanması

96 ml kloroform 4 ml izoamil alkol ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlandıktan sonra kabın ağzı sıkı bir şekilde kapatılmıştır ve +4°C de saklanmıştır.

3. 1. 7. c. %70'lik etanol hazırlanması

70 ml saf etanol alınmış, 30 ml d₂H₂O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve +4 °C de muhafaza edilmiştir.

3. 1. 7. d. H₂O: Otoklavda sterilize edilmiştir.

3. 1. 7. e. Saf etanol (%100)

3. 1. 7. f. Eritrosit parçalama tamponu (EPT) hazırlanması

TRİS	10 mM
Magnesium Chloride	5 mM
Sodium Chloride	10 mM

3. 1. 7. g. Lökosit parçalama tamponu (LPT) hazırlanması

TRİS	10 mM
EDTA (pH:8)	30 mM
SDS	% 0.5

Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. 2. Yöntem

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesindeki GÜDAM' dan alınan 14 tavşan ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji laboratuvarında bulunan kültür koleksiyonlarından sağlanan iki mantar kökeni ve iki bakteri kökeni bu çalışmaya dahil edilmiştir.

3. 2. 1. Mikroorganizma kökenleri

3. 2. 1. a. Mantar Kökenleri: *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305

3. 2. 1. b. Bakteri Kökenleri: *Escherichia coli* ATCC 10536 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

3. 2. 2. Kültür koleksiyonundaki örneklerin canlandırılması

Kültür koleksiyonundan seçilen örneklerin canlandırılması amacı ile, maya rneği (*Candida albicans*) sikloheksimit içeren SDA besiyerine pasajlanmış ve 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda üreme gözlenmeyen rnekler 37°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Koleksiyondan seçilen kf ise (*Aspergillus fumigatus*) sikloheksimit içermeyen SDA besiyerine pasajlanmış, hızlı bir üreme elde edebilmek amacı ile tıpkı mayalar gibi 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir.

Bakteri rnekleri (*Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*) kanlı agar besiyerine pasajlanmış ve 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir.

3. 2. 3. Hayvan modeli

Deney hayvanı olarak, her biri 2.7-3 kg ağırlığında, erkek, Yeni Zelanda ırkı tavşanlar kullanılmıştır. Kullanılan bütün hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı ile yapılmıştır (Onay No G..ET-09.032). Her kafeste iki adet tavşan olacak şekilde, 12/24 saat aydınlık ve karanlık uygulanmıştır, oda ısısı 20-25 °C de tutulmuştur. Tavşanlar standart yemle, yeme ve suya kolaylıkla olaşabilecek şekilde (add libitum) beslenmiştir. Deneklerin temiz içme suyu her gün değiştirilmiştir.

3. 2. 4. Hayvan modellerinde sepsis oluşturma

On dört tavşan alındıktan sonra dört gruba ayrılmıştır. Gruplar A, B, C ve kontrol grubu (S) olarak adlandırılmıştır. A, B ve C gruplarının her birinde dörder , kontrol grubunda ise iki adet tavşan bulunmaktaydı.

Her gruba (kontrol grubu hariç) farklı mikroorganizma süspansiyonları kulaktan intravenöz yolla enjekte edilmiştir. A grubundaki tavşanlara mantar süspansiyonu enjekte edilmiştir; A grubunun ikisine *Candida albicans* 10^6 maya/ml'den 1ml, ikisine *Aspergillus fumigatus* 10^6 konidya/ ml'den 1ml enjekte edilmiştir. B grubundaki tavşanlara bakteri süspansiyonu enjekte edilmiştir; ikisine *E. coli* 10^8 bakteri/ml'den 1 ml, ikisine de *S. aureus* 10^8 bakteri/ml'den 1 ml enjekte edilmiştir. C grubuna ise mantar ve bakteri süspansiyonlarını eşit oranlarda karıştırarak enjekte edilmiştir.

Süspansiyonlar enjekte edildikten sonra; tavşanlar gözlem altında tutulmuştur. Mantar süspansiyonu enjekte edilen A grubundaki tavşanlardan bir tanesi deneyin 72. saatinde ölmüştür. Ölen tavşan % 70'lik etil alkol ile silindikten sonra steril makas ve penset yardımı ile açılmıştır. Ölen tavşanın böbrek, dalak, karaciğer dokusu ve kan örnekleri alınmıştır. Canlı kalan tavşanların kan örnekleri kulak veninden alınmıştır. Canlı kalan diğer üç tavşanın ikisi 96. saatin sonunda, son tavşan ise durumu kötü olduğu için anestezi altında öldürülmüştür. Bütün tavşanlardan hem kan hem de doku örnekleri alınmıştır.

Bakteri süspansiyonu ile enjekte edilen B grubundaki dört tavşanın tümü 48. saatin sonunda ölmüş ve her birinden kan ve doku örnekleri alınmıştır.

Bakteri ve mantar süspansiyonu ile enfekte edilen C grubundaki tavşanlardan üç tanesi 48. saatin sonunda ölmüş, kan ve doku örnekleri alınmıştır. C grubundan geri kalan son tavşan ise 72. saatin sonunda ölmüş ve benzer şekilde bunlardan da kan ve doku örnekleri alınmıştır.

Kontrol grubundaki iki tavşan ise enfekte edilmemiş, deneyin sonlandırıldığı 96. saatin sonunda öldürülerek kan ve doku örnekleri alınmıştır. Tavşanlardan alınan tüm kan ve doku örnekleri -20°C de saklanmıştır.

3. 2. 5. Örneklerden total DNA eldesi

3. 2. 5. a. Kan örneklerinden total DNA eldesi

Kan örneklerinden DNA eldesi için fenol-kloroform-izoamil alkol (FKİ) yöntemi kullanılmıştır. FKİ yöntemini uygulamadan önce, kandan eritrosit ve lökositler uzaklaştırılmıştır. Aşağıdaki aşamalara göre yapılmıştır;

3. 2. 5. a. i. Eritrosit parçalama tamponu (EPT) aşaması

Kan örneklerinden eritrositleri uzaklaştırmak amacıyla eritrosit parçalama tamponu kullanılmıştır.

1. Her kan örneğinden 300 μ L temiz ependorflara alınmıştır.
2. Üzerine 900 μ L EPT solüsyonu eklenmiştir.
3. Ependorflar 15 saniye boyunca vortekslenmiştir.
4. Örnek 10,000 xg' de beş dakika santrifüj edilmiştir.
5. Üst sıvı dökülüp, çökelege tekrar 500 μ L EPT eklenmiştir.
6. Vortekslenen örnekler 10,000 xg' de beş dakika santrifüj edilmiştir.

3. 2. 5. a. ii. Lökosit parçalama tamponu (LPT) aşaması

EPT aşaması bittikten sonra, kan örneklerinden lökositleri uzaklaştırmak amacıyla lökosit parçalama tamponu kullanılmıştır.

1. EPT basamağı sonrasında kalan çökelek üzerine 10 μ L proteinaz K (100 mg/ml) ve 100 μ L LPT eklenmiştir.
2. Örnekler 65°C de iki saat inkübe edilmiştir.
3. Daha sonra 95°C de beş dakika daha inkübasyona bırakılmıştır.
4. Bütün örnekler 10,000 xg' de beş dakika santrifüj edilmiştir.

5. Üst sıvı temiz bir ependorfa alınmıştır.

3. 2. 5. a. iii. Fenol- kloroform- izoamil alkol (FKİ) ile saflaştırma yöntemi

FKİ yöntemi organik bir izolasyon yöntemidir. Nükleik asit solüsyonundan proteinleri uzaklaştırmak için standart bir yöntemdir. Fenol, organik bir çözücüdür ve DNA ve RNA' nın protein gibi diğer hücresel yapılardan ayrılmasını sağlar. Fenol negatif yüklüdür ve negatif yüklü DNA 'yı itip, tüpün üst kısmında, pozitif yüklü proteinlerin ise tüpün alt kısmında toplanmasına neden olur. Böylece, üst aköz tabakada hidrofilik olan DNA ve RNA; alt organik fazda hidrofobik olan protein, lipid gibi yapılar toplanır. DNA' nın fenol içinde çözünmesinin engellenmesi için fenol nötral pH' da olmalıdır.

Fenol–kloroform-izoamil alkol izolasyonunda yüksek moleküler ağırlıklı, kısmen saf olarak nükleik asit elde edilmesi sağlanabilir. İzole edilen DNA çift sarmallıdır. Ancak bu yöntemde, çok fazla örnek aktarması gerektiği için kontaminasyon riski fazladır. Ayrıca fenol gibi oldukça zararlı ve toksik kimyasalların kullanımını gerektirir. FKİ protokolü aşamaları:

1. LPT aşamasının sonunda, temiz ependorfa alınan üst sıvı üzerine 150 µL FKİ (25:24:1) eklenmiştir.

2. Örnekler 15 saniye boyunca vortekslenmiştir.

3. 14.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dipteki bulanık çökeltiyeye dokunmadan, temiz tüplere alınmıştır.

4. Üzerine 200 µL Kİ (24 :1) eklenmiş ve vortekslenmiştir.

5. 14.000 rpm' de beş dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dipteki bulanık çökeltiyeye dokunmadan, temiz tüplere alınmıştır.

6. Her 50 µL süpernatant için 125 µL %100'lük etil alkol eklenmiştir.

7. 14.000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilmiştir.

8. Bu sefer süpernatant dökülmüş, çökelege 200 µL %70' lik etil alkol eklenmiştir. Bu şekilde yıkama ikinci defa tekrar edilmiştir.

9. 14.000 rpm' de beş dakika santrifüj edilmiş.

10. Ependorf içersindeki alkol, ependorfta hiç damla kalmayacak şekilde alınmış ve kurutmaya bırakılmıştır.

11. Kuruyan DNA'nın üzerine 30 µL Tris ve EDTA (TE) ile hazırlanan örnek çözme tamponu eklenmiştir.

12. Elde edilen total DNA miktarları DNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek DNA varlığı kontrol edilmiştir. daha sonra DNA'lar -20° C de saklanmıştır.

3. 2. 5. b. Doku örneklerinde total DNA eldesi

Tavşanlardan alınan böbrek, karaciğer ve dalak dokularından DNA elde edilmesi için High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

İşlem bu protokole göre yapılmıştır;

1. 0.1-0.5 g doku steril tüpe alınmıştır.
2. Doku örneği üzerine EPT eklenmiştir. Yukarıda anlatıldığı şekilde EPT basamağı uygulanmıştır.
3. Kalan çökelek üzerine 200 µL bağlama tamponu (Binding Buffer), ve 20 µL proteinaz K (100mg/ml) eklenmiştir.
4. 10 dakika 72°C de inkübe edilmiştir. Bu karışım daha sonra toplama tüpleri üzerindeki filtrelerin üzerine aktarılmıştır.
5. Bir dakika 8000 xg' de santrifüj edilmiştir.
6. Toplama tüpü içindikileri ile birlikte atılmıştır.
7. Filtre yeni toplama tüpüne dikkatlice aktarılmıştır.
8. 500 µL inhibitör uzaklaştırma tamponu konulmuştur.
9. Bir dakika 8000 xg 'de santrifüj edilmiştir.
10. Toplama tüpü içindikileri ile birlikte atılmıştır.
11. Filtre yeni toplama tüpüne dikkatlice birleştirilmiştir.
12. 450 µL yıkama tamponu eklenmiştir.
13. Bir dakika 8000 xg' de santrifüj edilmiştir.
14. Toplama tüpü içindikileri ile birlikte atılmıştır.
15. Filtre yeni toplama tüpüne dikkatlice birleştirilmiştir.
16. Bir kere daha 450 µL yıkama tamponu eklenmiştir.
17. Bir dakika 8000 xg' de santrifüj edilmiştir. Devam ederek 10 saniye 13.000 xg' de santrifüj edilmiştir.
18. Toplama tüpü içindikileri ile birlikte atılmıştır.
19. Filtre 1.5 ml'lik ependorf tüpüne dikkatlice aktarılmıştır.

20. 50 µL süzme (elution) tamponu eklenmiştir.

21. Bir dakika 8000 xg' de santrifüj edilmiştir.

22. Elde edilen total DNA miktarları DNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek DNA varlığı kontrol edilmiştir, daha sonra DNA'lar -20° C de saklanmıştır.

3. 2. 5. c. Koloniden ve kontamine edilen hasta kanından total DNA eldesi

Tavşan modeli yanında, bakteri ve mantar kolonilerinden DNA elde edilmiş ve bu koloni örnekleri de incelenmiştir. Bir üçüncü örnek tipi olarak da, hasta kanı örneklerine mantar ve bakteri kolonileri ekleyerek kontamine edilen örnekler hazırlanmıştır.

Koloniden total DNA eldesi aşamasında, iki tane mantar kökeni (*C. albicans* ATCC 10231 ve *A. fumigatus* ATCC 204305) ve iki tane bakteri kökeni (*E. Coli* ATCC 10536 ve *S. aureus* ATCC 6538) kullanarak DNA izole edilmiştir. Koloni ve kontamine edilen hasta kan örnekleri için Heliosis kiti (Metis,Türkiye) izolasyon yöntemini kullanılarak DNA'lar izole edilmiştir.

3. 2. 5. c. i. Koloniden total DNA izolasyonu

1. Her koloniden öze ile bir miktar alıp 100 µL serum fizyolojik içinde çözülmüştür.

2. Üzerine 100 µL parçalama (digestion buffer) solüsyonu ve 5 µL proteinaz K (100mg/ml) eklenmiştir.
3. Örnek 65°C de iki saat ya da 55°C de üç saat inkübe edilmiştir.
4. Daha sonra 95°C de 10 dakika inkübe etmeye devam edilmiştir.
5. 10.000 rpm' de bir dakika santrifüj edilmiştir.
6. Tüpün dibine değmeden üst sıvıdan 100 µL temiz tüplere aktarılmıştır.
7. Üzerine 400 µL DNA erime/bağlama (Binding buffer) solüsyonu eklenmiştir. Pipetle beş- altı kez karıştırılıp lizis yapılmıştır.
8. Karışım 65°C de 10 dk' yı takiben +4°C de bekletilmiştir.
9. Ependorf tüpün kapakları açılmadan önce spin santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µL DNA çöktürme solüsyonu eklenmiştir ve sonra beş- altı kez bir aşağı bir yukarı karıştırılmıştır.
10. 15 dk 13,000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
11. Üst kısım pipetle tekrar tamamen alıp, vakumlu santrifüj ile (yaklaşık iki- beş dakika) kurutulmuştur.
12. Son olarak 50 µL DNA örnek çözme tamponu ile sulandırılmıştır.
13. Elde edilen total DNA miktarları DNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek DNA varlığı kontrol edilmiştir, daha sonra DNA'lar -20° C de saklanmıştır.

3. 2. 5. c. ii. kontamine hasta kanından DNA izolasyonu

1. Her kan örneğinden 300 µL alıp, üzerine 1000 µL eritrosit parçalama tamponu (EPT) eklenmiştir.
2. Örnek -20°C de beş dakika bekletilmiştir.
3. 10,000 rpm' de üç dakika santrifüj edilmiştir.
4. Üst sıvı pipetle alıp atılmıştır. Çökelek üzerine tekrar 1000 µL (EPT) eklenmiştir.
5. Örnek -20°C de beş dakika bekletilmiştir.
6. 10,000 rpm' de üç dakika santrifüj edilmiştir.
7. Üst sıvı pipetle çekip atıldıktan sonra çökeleğin üzerine 100 µL digestion buffer ve 5 µL proteinaz K (100mg/ml) eklenmiştir.
8. Örnek 65°C de iki saat ya da 55°C de üç saat inkübe edilmiştir.
9. Daha sonra 95°C de 10 dakika inkübasyona devam edilmiştir.
10. 10.000 rpm' de bir dakika santrifüj edilmiştir.
11. Üzerine 400 µL DNA Erime/ Bağlama Solüsyonu eklenmiştir. Pipetle beş- altı kez karıştırılıp lizis yapılmıştır.
12. Karışım 65°C de 10 dakikayı takiben +4°C de bekletilmiştir.
13. Ependorf tüpün kapakları açılmadan önce spin santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µL DNA çöktürme solüsyonu eklenmiş ve sonra beş- altı kez bir aşağı bir yukarı karıştırılmıştır.
14. 15 dakika 13,000 rpm' de santrifüj edilmiştir.

15. Üst kısım pipetle tamamen alınıp, üzerine 500 µL DNA yıkama solüsyonu eklenmiştir.

16. Beş dakika 13,000 rpm' de santrifüj edilmiştir.

17. Üst kısım tekrar tamamen alıp, vakumlu santrifüj ile (yaklaşık iki-beş dakika) kurutulmuştur.

19. Son olarak 50 µL DNA örnek çözme tamponu ile sulandırılmıştır.

20. Elde edilen total DNA miktarları DNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek DNA varlığı kontrol edilmiştir, daha sonra DNA'lar -20°C de saklanmıştır.

3. 2. 6. Örneklerin DNA'larının gerçek zamanlı PZR

cihazında çoğaltılması

Çoğaltma basamağı için en az 10 ng/µL DNA kullanılmıştır. Çoğaltma için LightCycler (Roche diagnostics, Tenay, Turkey) cihazı ve LightCycler yazılımının 4.0 versiyonu kullanılmıştır. Deneklerin kan ve dokularından, kontamine edilen hasta kan örneklerinden ve koloniden (reaksiyonda pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır) elde edilen DNA' lar; bakteri ve mantar grubu olarak ikiye ayrılmıştır. Bakteri grubu, hem gram pozitif hem de gram negatif olarak ayrılmıştır ve DNA çoğaltmasında bu gruba özgül primer ve probler kullanılmıştır. Mantar grubu ise, hem küf (*Aspergillus*) hem de maya (*Candida*) olarak ayrılmıştır ve DNA çoğaltmasında bu gruba özgül primer ve probler kullanılmıştır.

Tablo 3. 1: Gerçek zamanlı PZR’ da kullanılan primer ve problemler

Primer	5’-3’ yönünde dizi
<i>Candida</i> primer forward	CCT-GTT-TGA-GCG-TCR-TTT
<i>Candida</i> primer reverse	TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT
<i>Candida</i> probe	6-FAM-CAT-TGC-TTG-CGG-CGG-TA-TMR
<i>Aspergillus</i> primer forward	CTG-TCC-GAG-CGT-CAT-TG
<i>Aspergillus</i> primer reverse	TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT
<i>Aspergillus</i> probe	6-FAM- AGC-CGA-CAC-CCA-ACT-TTA-TTT-TMR
Pan- bakteriyel primer forward	CAA-CGC-GAA-GAA-CCT-TAC-C
Pan- bakteriyel primer reverse	ACG-TCA-TCC-CCA-CCT-TCC
Gram pozitif prob	5-FAM-ACG-ACA-ACC-ATG-CAC-CAC-CTG-TMR
Gram negatif prob	5-HEX-ACG-ACA-GCC-ATG-CAG-CAC-CT-TMR

Gerçek zamanlı PZR iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Erime eğrisi (Melting curve) analizi yapılan uygulamalar:
Pan-bakteriyel PZR, çok hedefli (Bakteri+Mantar) PZR.
2. Prob teknolojisi kullanılan uygulamalar: Gram negatif PZR,
gram pozitif PZR, *Candida* PZR, *Aspergillus* PZR.

Erime eğrisi analizi yapıldığı zaman amplifikasyon karışımı, kalıp DNA, FastStart DNA SYBR Master karışım tamponu, her bir bakteri veya mantar primerler (Eurogentec, Belçika) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Prob içeren teknoloji kullanılacağı zaman amplifikasyon karışımı, kalıp DNA, FastStart DNA Master HybProbe karışım tamponu,

her bir bakteri veya mantar primeri (Eurogentec, Belçika) ve problemleri (Eurogentec, Belçika) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Karışım malzemeleri -20° C de saklanmış. Karışım +4° C de soğutulan kurşun blok içinde hazırlanmış. Kurşun blok karışım odasında (temiz oda) örnek sayısı kadar kapiller ile doldurulmuştur. Karışım malzemesi soğutucudan çıkarıldıktan sonra, tüpler alt üst edilerek karıştırılmıştır (fazla vorteksten yapılmadan). Enzimler vortekslenmemiştir. Primerler, MgCl₂ ve su vorteks ve spin yapılmıştır. Spin yapılmadan tüplerin kapakları açılmamıştır.

Tablo 3. 2: Bakteri primerleri kullanarak; sepsis tanısı için hazırlanan TaqMan PZR karışımı

Karışım	1X	15X
Su	2 µL	30 µL
MgCl ₂ (25mM)	1 µL	15 µL
<i>S. aureus/ E.coli</i> Fw primer	1 µL	15 µL
<i>S. aureus/ E.coli</i> Rev primer	1 µL	15 µL
<i>S. aureus/ E.coli</i> probe	0.5 µL	7.5 µL
Enzim	2 µL	30 µL
Toplam Hacim	7.5 µL	112.5 µL

Tablo 3. 3: Mantar primerleri kullanarak; sepsis tanısı için hazırlanan TaqMan PZR karışımı

Karışım	1X	15X
Su	2 µL	30 µL
MgCl ₂ (25mM)	1 µL	15 µL
<i>Candida/ Aspergillus</i> Fw primer	1 µL	15 µL
<i>Candida/ Aspergillus</i> Rev primer	1 µL	15 µL
<i>Candida/ Aspergillus</i> probe	0.5 µL	7.5 µL
Enzim	2 µL	30 µL
Toplam Hacim	7.5 µL	112.5 µL

Her örnek için hazırlanan ana karışımdan 7.5 µl, DNA' dan ise 2.5 µl kapillerlere eklenmiştir. Amplifikasyon kontrolü için sadece karışımdan 10 µL bir kapiller içerisine konulmuş (içinde DNA yoktur). Buna negatif kontrol kabul edilmiş ve sadece bu kapillerin kapağı karışım odasında (temiz oda) kapatılmıştır. Diğerleri ise kurşun bloğun içinde ekstraksiyon odasında bulunan biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye) içine götürülmüş ve orada DNA örneği eklenmiştir. Örnekler hızlı bir şekilde spin santrifüj edilerek LightCycler® 2.0 (Roche, Almanya) cihazına yerleştirilmiştir.

Prob kullanıldığı için amplifikasyon üç aşamada gerçekleştirilmiştir; denatürasyon (95°C 'de 10 saniye, sıcaklık değişimi 10°C/saniye), hibridizasyon (zaman ve sıcaklık primerlere bağlı, sıcaklık değişimi 5-20°C/saniye), uzama (72°C'de primerlere göre değişen zamanlarda, sıcaklık değişimi 20°C/saniye). Gerçek zamanlı PZR amplifikasyonu sonrasında, "absolute quantification" analizi incelenmiştir.

3. 2. 7. Bazı örneklerde DNA'ların çok hedefli PZR ile gösterilmesi

Master SYBR green I (ROCHE, Almanya) kiti kullanılarak kan, doku ve koloni örneği gibi bazı örneklerde mantar ve bakteri DNA'ları bir arada, tek reaksiyonda gösterilmiştir.

Tablo 3. 4: Çok hedefli (Mütiipleks) PZR karışımı

Karışım	1X	10X
Su	2.5 µL	25µL
MgCl ₂ (25mM)	2 µL	20µL
<i>Candida/ Aspergillus</i> Fw primer	0.5 µL	5µL
<i>Candida/ Aspergillus</i> Rev primer	0.5 µL	5µL
<i>S. aureus/ E.coli</i> Fw primer	0.5 µL	5µL
<i>S. aureus/ E.coli</i> Rev primer	0.5 µL	5µL
Enzim	1 µL	10µL
Toplam Hacim	7.5 µL	75µL

Her örnek için hazırlanan ana karışımdan 7.5 µl, DNA' dan ise 2.5 µl (mantar+ bakteri DNA'ları) kapillerlere eklenmiştir. Amplifikasyon kontrolü için sadece karışımdan 10 µL bir kapiller içerisine konulmuş (içinde DNA yoktur). Bu kapiller negatif kontrol olarak kabul edilmiş ve sadece bu kapillerin kapağı karışım odasında (temiz oda) kapatılmıştır. Diğerleri ise kurşun bloğun içinde ekstraksiyon odasında bulunan biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye) içine götürülmüş ve orada DNA örneği eklenmiştir. Örnekler hızlı bir şekilde spin santrifüj edilerek LightCycler® 2.0 (Roche, Almanya) cihazına yerleştirilmiştir.

Erime eğrisi (Melting curve) analizi yapıldığı zaman, amplifikasyon üç aşamada gerçekleştirilmiştir; denatürasyon (95°C'de 10 saniye, sıcaklık değişimi 10°C/saniye), hibridizasyon (55°C'de 10 saniye, sıcaklık değişimi 5-20°C/saniye), uzama (72°C'de 15 saniye, sıcaklık değişimi 20°C /saniye). Amplifikasyon sonucu erime eğrisi analizi ile incelenmiştir.

Tablo 3. 5: Gerçek zamanlı PZR' da kullanılan LightCycler yazılım raporu (SYBR green)

LightCycler Software Version 4.0

Roche

Report

08.10.2009 SYBR GREEN

Experiment

Creation Date	08.10.2009 10:32:07	Last Modified Date	08.10.2009 12:06:29
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	08.10.2009 11:24:24	End Time	08.10.2009 12:06:29
Run State	Completed	Software Version	LCS4 4.0.0.23
Macro		Macro Owner	
Templates	Panfungal-SYBR		
Run Notes			

Programs

Program Name	denaturation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95	00:00:30	20	0	0	0	None	

Program Name	amplification						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95	00:00:00	20	0	0	0	None	
55	00:00:10	20	0	0	0	None	
72	00:00:00	20	0	0	0	Single	

Program Name	melting curve						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95	00:00:00	20	0	0	0	None	
65	00:00:15	20	0	0	0	None	
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous	

Program Name	cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
40	00:00:30	20	0	0	0	None	

Tablo 3. 6. Gerçek zamanlı PZR' da kullanılan LightCycler yazılım raporu (TaqMan)

LightCycler Software

Version 4.0





07.10.2009 taqman

Experiment

Creation Date	07.10.2009 14:22:05	Last Modified Date	07.10.2009 16:51:01
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	07.10.2009 15:32:37	End Time	07.10.2009 16:51:01
Run State	Completed	Software Version	LCS4 4.0.0.23
Macro		Macro Owner	
Templates	taqman		
Run Notes			

Programs

Program Name	Denaturation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95	00:10:00	20	0	0	0	None	

Program Name	Amplification						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95	00:00:10	20	0	0	0	None	
60	00:00:40	20	0	0	0	Single	

Program Name	Cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
40	00:00:00	20	0	0	0	None	

3. 2. 8. Kontaminasyona karşı alınan önlemler

DNA ekstraksiyonu ve PZR'ları steril koşullarda ve birbirinden farklı odalarda gerçekleştirilmiştir. Mikrosantrifüj tüpleri otoklavda ve ultraviyoleye (UV) maruz bırakılarak steril edilmiştir. Ayrıca tüm reaksiyonlar güvenlik kabininde yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan primer ve problemler her birinden ara stoklar hazırlanmıştır ve reaksiyon malzemelerini taşıyan mikrotüpleri açmadan önce spin santrifüj yapılmıştır. Her reaksiyon için negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır. Bütün işlemler eldiven kullanarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4. 1. Sepsis Etkenlerinin Gösterilmesi

4.1.1. Sepsis etkenlerinin kültürde üretilmesi

Tavşanlardan alınan kan örnekleri pediatrik kan kültür şişelerine eklenmiştir. Kùltürler yedi gün takip edilmiştir. Üreme sinyali veren şişelerden, rutinde kullanılan SDA ve kanlı agar besiyerlerine subkùltürler yapılmıştır. Üreyen bakteriler ve mantarlar laboratuvarında kullanılan PZR yöntemi ile tanımlanmıştır.

4. 1. 2. Sepsis etkenlerinin doğrulanması

Sepsisli tavşanlardan alınan bütün kan örneklerinde, kùltür ile (konvansiyonel) ve moleküler yöntemler ile sepsis tanısı doğrulanmıştır. Tavşanlardan alınan kan örneklerinde intravenöz olarak verilen mikroorganizma kolonileri üretilmiştir. Deneklerin kan ve dokularından elde edilen DNA'lar hem bakteriyel hem de fungal primerler ve probalar kullanarak çoğaltıldığında, enfekte olan gruplarda intravenöz olarak verilen etkenler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubunda ise, negatif sonuç elde edilmiştir.

Aynı zamanda gerçek zamanlı PZR testin özgüllük ve duyarlılığını değerlendirmek ve çalışmada kullanılan primer ve propların etkinliğini belirlemek amacı ile pozitif kontrol olarak koloni süspansiyonları ve kontamine edilen kan örnekleri hazırlanmıştır. Koloni ve kontamine kan örneklerinin gerçek zamanlı PZR test sonuçları Tablo 4.7 ve 4.8’ de gösterilmektedir.

4. 2. Moleküler Yöntemlerle Sepsisin Tanımlanması

4. 2. 1. Nanodrop ile DNA miktarı ölçümü

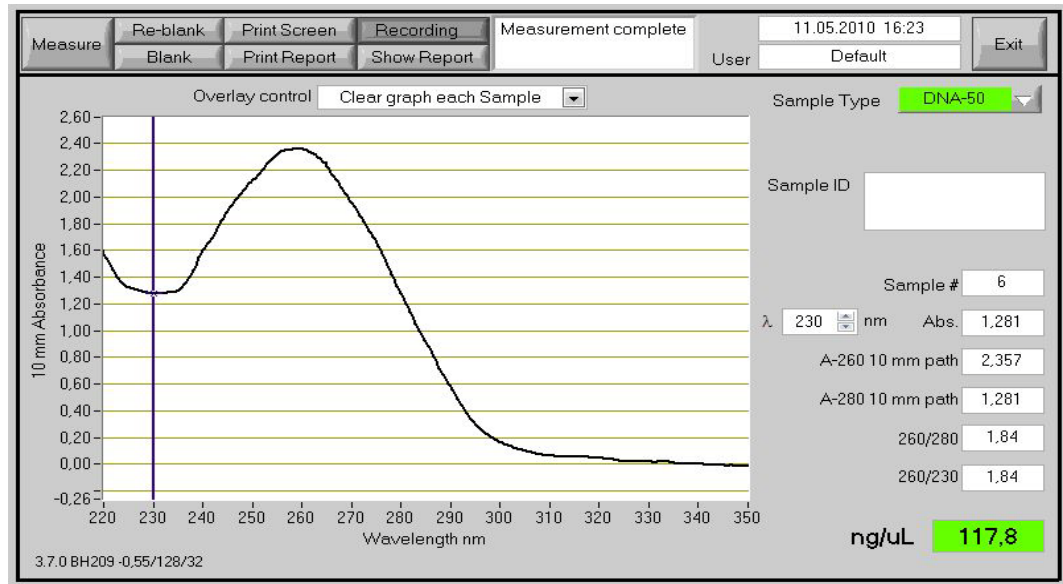
Ticari kit ile DNA izolasyonu yapılan örneklerdeki total DNA miktarı NanoDrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Tablo 4. 1: Sepsisli kan örneklerinden elde edilen total DNA miktarları

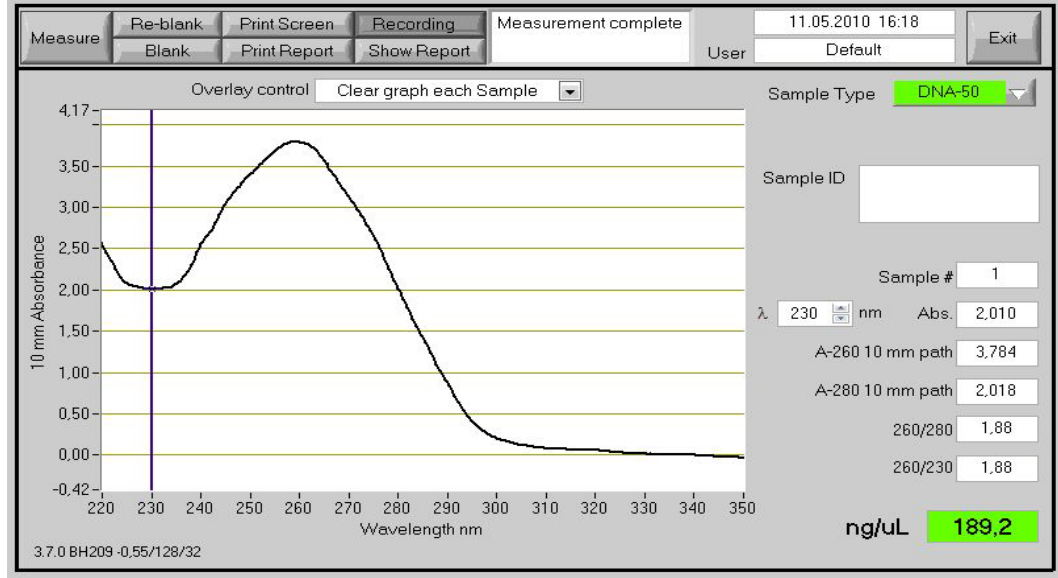
Örnek No	DNA ölçümleri
1	15.2 ng/ µl
2	14.3 ng/ µl
3	18.4 ng/ µl
4	25.7 ng/ µl
5	20.3 ng/ µl
6	23.4 ng/ µl
7	32.7 ng/ µl
8	31.4 ng/ µl
9	35.9 ng/ µl
10	34.2 ng/ µl
11	45.9 ng/ µl
12	37.8 ng/ µl
13	25.0 ng/ µl
14	35.5 ng/ µl
15	30.2 ng/ µl
16	33.8 ng/ µl
17	38.1 ng/ µl
18	43.2 ng/ µl
19	46.5 ng/ µl
20	19.0 ng/ µl
21	31.3 ng/ µl
22	55.1 ng/ µl
23	117.8 ng/ µl
24	38.1 ng/ µl
25	29.4 ng/ µl
26	44.5 ng/ µl
27	50.2 ng/ µl

Tablo 4. 2: Sepsisli doku örneklerinden elde edilen total DNA miktarları

Örnek No	Dalak	Böbrek	Karaciğer
1	243.1 ng/ µl	85.6 ng/ µl	100.9 ng/ µl
2	310.0 ng/ µl	50.7 ng/ µl	90.9 ng/ µl
3	395.0 ng/ µl	36.7 ng/ µl	189.2 ng/ µl
4	808.8 ng/ µl	61.0 ng/ µl	109.0 ng/ µl
5	567.9 ng/ µl	58.9 ng/ µl	173.8 ng/ µl
6	312.2 ng/ µl	45.9 ng/ µl	90.8 ng/ µl
7	462.4 ng/ µl	40.7 ng/ µl	149.1 ng/ µl
8	749.4 ng/ µl	71.9 ng/ µl	128.2 ng/ µl
9	630.6 ng/ µl	39.9 ng/ µl	224.2 ng/ µl
10	369.2 ng/ µl	90.2 ng/ µl	200.6 ng/ µl
11	567.8 ng/ µl	79.2 ng/ µl	180.5 ng/ µl
12	357.2 ng/ µl	79.5 ng/ µl	152.8 ng/ µl
13	652.9 ng/ µl	106.3 ng/ µl	196.0 ng/ µl
14	415.9 ng/ µl	102.8 ng/ µl	214.6 ng/ µl



Grafik 4.1: NanoDrop analiz ekranı örnek DNA ölçüm görüntüsü (kan örneği)



Grafik 4.2: NanoDrop analiz ekranı örnek DNA ölçüm görüntüsü (doku örneği)

4. 2. 2. Gerçek zamanlı PZR' ile sepsis etkenlerinin analizi

Elde edilen DNA'lar LightCycler (Roche diagnostics, Tenay, Turkey) cihazında, bakterilerin 16S rDNA ve mantarların 5.8S rDNA gen bölgelerine spesifik primerler ve problemler kullanılarak ayrı ayrı PZR işlemine alınmıştır. Mutlak ölçüm (absolute quantification) yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar tablolarda sunulmaktadır.

4. 3. Kontrol Grubunun Sonuçları

Sağlıklı kontrol gruplarından (S grubu) alınan kan örneklerinin kültürlerinde üreme olmamıştır. Ayrıca doku ve kan örneklerine uygulanan gerçek zamanlı PZR ile hiçbir örnekte bakteri ya da mantar DNA' sı saptanmamıştır.

4. 4. Kan Örneklerinin Gerçek Zamanlı PZR Test Sonuçları

PZR ile tam kan örneklerinde mantar ve bakteri DNA'sı araştırılmıştır. A ve C gruplarındaki (canlı ve ölü) toplam 21 kan örneğine ayrı ayrı *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* için özgül PZR uygulanmıştır. *Aspergillus* PZR' da 10 tane (%47.61) ve *Candida* PZR' da ise altı tane (%28.57) pozitif sonuç elde edilmiştir. B ve C gruplarından alınan (canlı ve ölü) toplam 10 kan örneğin bakteriler için PZR ile incelenmesinde, intravenöz *S. aureus* verilen tüm örneklerde gram pozitif PZR (%100) pozitif, *E. coli* verilen örneklerinin altı tanesinde gram negatif PZR (%60) pozitif bulunmuştur.

Tablo 4. 3: Sepsisli tavşan kanlarının gerçek zamanlı PZR test sonuçları

Örnek No	Tavşan grubu	Mantar		Gram -	Gram +
		<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>		
1	A1/canlı 24. saat	-	+	*	*
2	A2/canlı 24. saat	-	+	*	*
3	A3/canlı 24. saat	-	-	*	*
4	A4/canlı 24. saat	-	+	*	*
5	A1/canlı 48. saat	-	-	*	*
6	A2/canlı 48. saat	-	-	*	*
7	A3/canlı 48. saat	-	-	*	*
8	A4/canlı 48. saat	-	+	*	*
9	A1/canlı 72. saat	+	-	*	*
10	A2/canlı 72. saat	+	-	*	*
11	A3/canlı 72. saat	-	+	*	*
12	A4/ ölü 72. saat	-	+	*	*
13	A1/kesildi 96. saat	-	+	*	*
14	A2/ ölü 96. saat	-	+	*	*
15	A3 /ölü 96. saat	-	+	*	*
16	B1/ölü 24. saat	*	*	+	+
17	B2/ölü 24. saat	*	*	+	+
18	B3/ölü 24. saat	*	*	+	+
19	B4/ölü 24. saat	*	*	-	+
20	C1/ölü 48. saat	+	-	-	+
21	C2/ölü 48. saat	+	-	-	+
22	C3/ölü 48. saat	+	-	-	+
23	C4/canlı 24. saat	-	+	+	+
24	C4/canlı 48. saat	+	-	+	+
25	C4/ölü 72. saat	-	-	+	+
26	S1/kesildi 96. saat	-	-	-	-
27	S1/kesildi 96. saat	-	-	-	-

+: Pozitif sonuç

- : Negatif sonuç

*** : PZR Yapılmadı**

A: *A. fumigatus* ve *C. albicans* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

B: *E. coli* ve *S. aureus* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

C: Mantar ve bakteri süspansiyonlarını eşit oranlarda karıştırarak enjekte edilen tavşan grubu,

S: sağlıklı kontrol grubu,

Gram-: gram negatif bakteri,

Gram+: gram pozitif bakteri.

4. 5. Doku Örneklerinin Gerçek Zamanlı PZR Test Sonuçları

Deneklerden alınan doku (dalak, karaciğer ve böbrek) örneklerinde PZR ile mantar ve bakteri DNA' sı araştırılmıştır. A ve C gruplarındaki toplam sekiz dalak örneğine ayrı ayrı *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* PZR yapılmıştır. *Aspergillus* PZR'da tüm örnekler (%100) pozitif, *Candida* PZR'da ise üç örnekte (%37.5) pozitif bulunmuştur.

A ve C gruplarındaki toplam sekiz böbrek örneğinde *Aspergillus* PZR tüm örneklerde (%100) pozitif saptanırken, *Candida* PZR'da ise bir örnekte (%12.5) pozitif saptanmıştır. Bu iki grubun sekiz karaciğer örneğinde, *Aspergillus* PZR tüm örneklerde (%100) pozitif bulunurken, *Candida* PZR üç örnekte (%37.5) pozitif saptanmıştır.

Deneklerden alınan doku örneklerinde bakteri DNA'sını saptamak için yapılan PZR çalışmalarına B ve C grupları dahil edilmiştir. Bu iki gruptaki toplam sekiz dalak örneğinde gram pozitif bakteri (*S. aureus*) varlığını saptamak amacıyla yapılan gram pozitif PZR' da beş örnekte (%62.5) *S. aureus* DNA'sı pozitif gözlenirken, yapılan gram negatif PZR'da dört örnekte (%50) *E. coli* DNA' sı pozitif saptanmıştır. Yine bu iki gruptaki toplam sekiz böbrek örneğinin ikisinde (%25) *S. aureus* DNA'sı pozitif iken, dört örnekte (%50) *E. coli* DNA'sı pozitif bulunmuştur.

Son olarak ise sekiz karaciğer örneği PZR ile çalışılmış ve dört örnekte (%50) *S. aureus* pozitifken, beş örnekte (%62.5) ise *E. coli* pozitif gözlenmiştir.

Tablo 4. 4: Dalak örneklerinin gerçek zamanlı PZR test sonuçları

Örnek No	Tavşan grubu	Mantar <i>Candida</i>	Mantar <i>Aspergillus</i>	Gram -	Gram +
1	A1	-	+	*	*
2	A2	-	+	*	*
3	A3	-	+	*	*
4	A4	-	+	*	*
5	B1	*	*	+	+
6	B2	*	*	+	+
7	B3	*	*	+	+
8	B4	*	*	-	-
9	C1	+	+	-	+
10	C2	+	+	+	+
11	C3	+	+	-	-
12	C4	-	+	-	-
13	S1	-	-	-	-
14	S2	-	-	-	-

+: Pozitif sonuç

- : Negatif sonuç

* : PZR Yapılmadı

A: *A. fumigatus* ve *C. albicans* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

B: *E. coli* ve *S. aureus* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

C: Mantar ve bakteri süspansiyonlarını eşit oranlarda karıştırarak enjekte edilen tavşan grubu,

S: Sağlıklı kontrol grubu,

Gram-: gram negatif bakteri,

Gram+: gram pozitif bakteri.

Tablo 4. 5: Böbrek örneklerinin gerçek zamanlı PZR test sonuçları

Örnek No	Tavşan grubu	Mantar <i>Candida</i>	Mantar <i>Aspergillus</i>	Gram -	Gram +
1	A1	-	+	*	*
2	A2	-	+	*	*
3	A3	-	+	*	*
4	A4	-	+	*	*
5	B1	*	*	+	-
6	B2	*	*	+	+
7	B3	*	*	+	-
8	B4	*	*	-	+
9	C1	-	+	-	-
10	C2	+	+	+	-
11	C3	-	+	-	-
12	C4	-	+	-	-
13	S1	-	-	-	-
14	S2	-	-	-	-

+: Pozitif sonuç

- : Negatif sonuç

* : PZR Yapılmadı

A: *A. fumigatus* ve *C. albicans* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

B: *E. coli* ve *S. aureus* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

C: Mantar ve bakteri süspansiyonlarını eşit oranlarda karıştırarak enjekte edilen tavşan grubu,

S: Sağlıklı kontrol grubu,

Gram-: gram negatif bakteri,

Gram+: gram pozitif bakteri.

Tablo 4. 6: Karaciğer örneklerinin gerçek zamanlı PZR test sonuçları

Örnek No	Tavşan grubu	Mantar		Gram -	Gram +
		<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>		
1	A1	-	+	*	*
2	A2	-	+	*	*
3	A3	-	+	*	*
4	A4	-	+	*	*
5	B1	*	*	+	-
6	B2	*	*	+	-
7	B3	*	*	+	-
8	B4	*	*	-	+
9	C1	+	+	+	+
10	C2	+	+	+	+
11	C3	+	+	-	+
12	C4	-	+	-	-
13	S1	-	-	-	-
14	S2	-	-	-	-

+: Pozitif sonuç

- : Negatif sonuç

* : PZR Yapılmadı

A: *A. fumigatus* ve *C. albicans* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

B: *E. coli* ve *S. aureus* süspansiyonu ile enjekte edilen tavşan grubu,

C: Mantar ve bakteri süspansiyonlarını eşit oranlarda karıştırarak enjekte edilen tavşan grubu,

S: Sağlıklı kontrol grubu,

Gram-: gram negatif bakteri,

Gram+: gram pozitif bakteri.

Tablo 4. 7: Koloni örneklerinin gerçek zamanlı PZR test sonuçları

Örnekler	Mantar <i>Candida</i>	Mantar <i>Aspergillus</i>	Gram-	Gram+
<i>E. coli</i>	*	*	+	-
<i>S. aureus</i>	*	*	-	+
<i>C. albicans</i>	+	-	*	*
<i>A. fumigatus</i>	-	+	*	*

+: Pozitif sonuç,

- : Negatif sonuç,

* : PZR Yapılmadı,

Gram-: gram negatif bakteri,

Gram+: gram pozitif bakteri.

Tablo 4. 8: Kontamine edilen Kan örneklerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları

Örnekler	Mantar <i>Candida</i>	Mantar <i>Aspergillus</i>	Gram -	Gram +
<i>E. coli</i>	*	*	+	-
<i>S. aureus</i>	*	*	-	+
<i>C. albicans</i>	+	-	*	*
<i>A. fumigatus</i>	-	+	*	*

+: Pozitif sonuç,

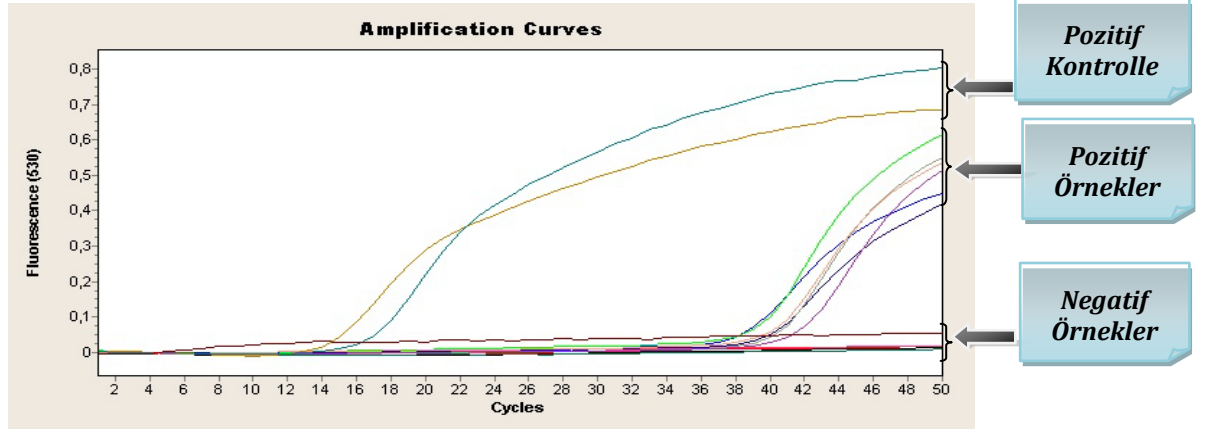
- : Negatif sonuç,

* : PZR Yapılmadı,

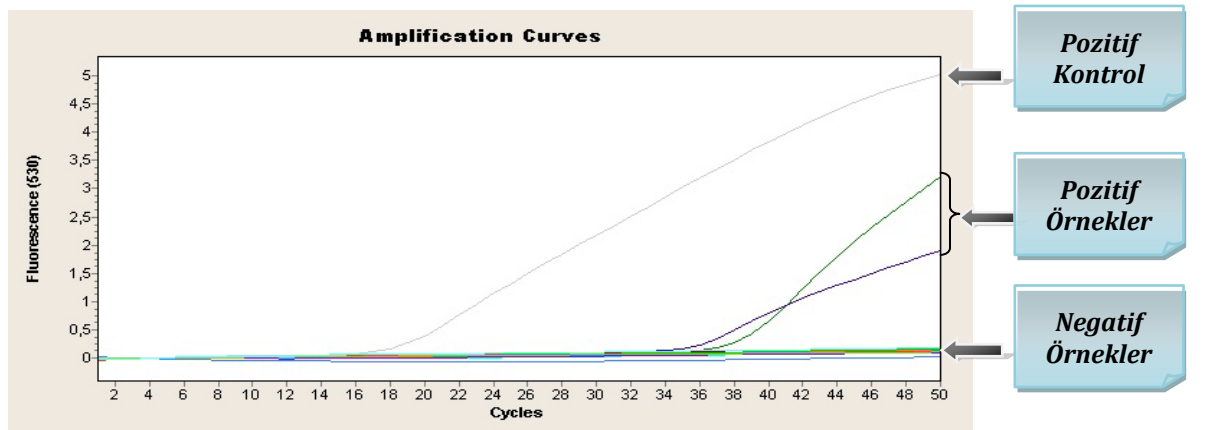
Gram-: gram negatif bakteri,

Gram+: gram pozitif bakteri.

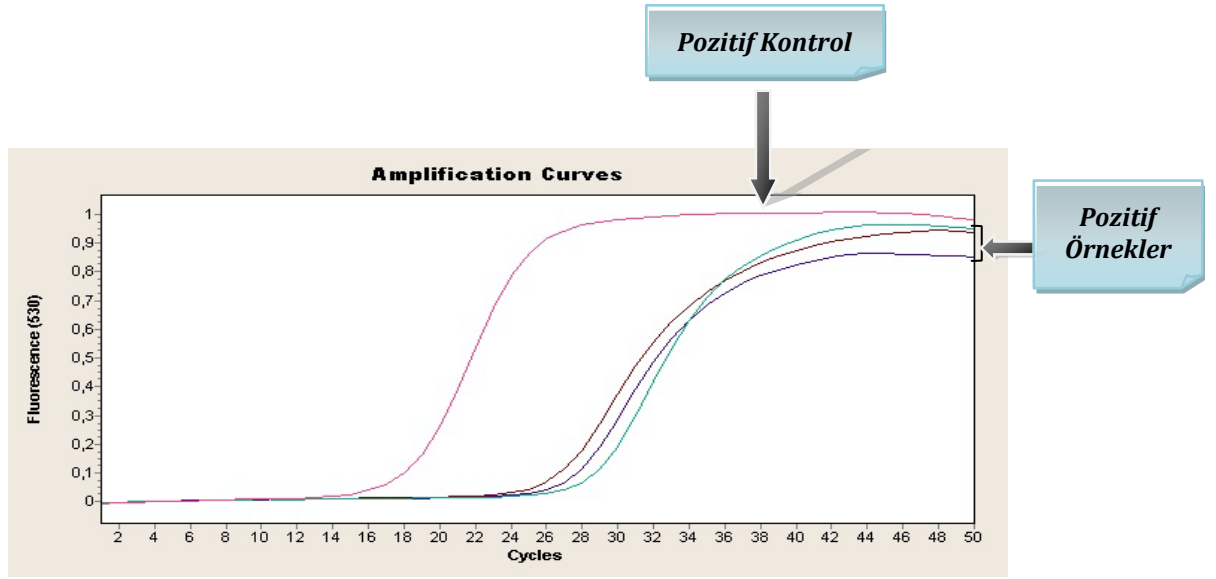
4. 6. Gerçek Zamanlı PZR Amplifikasyon Eğrileri



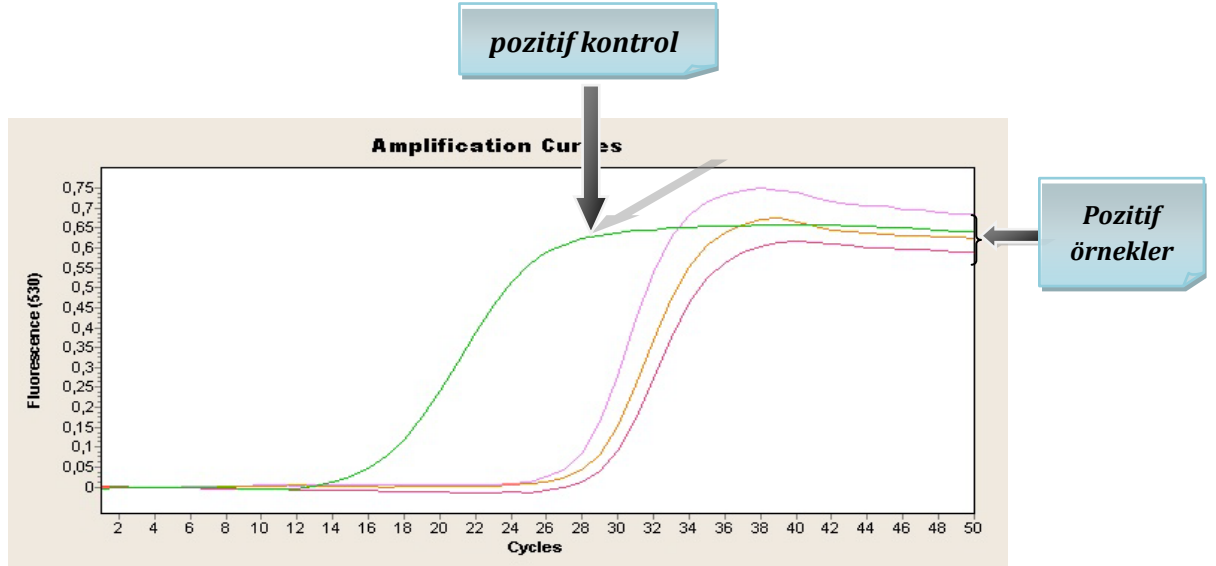
Grafik 4. 3: A ve C grubu tavşanların *A. fumigatus* amplifikasyon eğrileri (kan örnekleri)



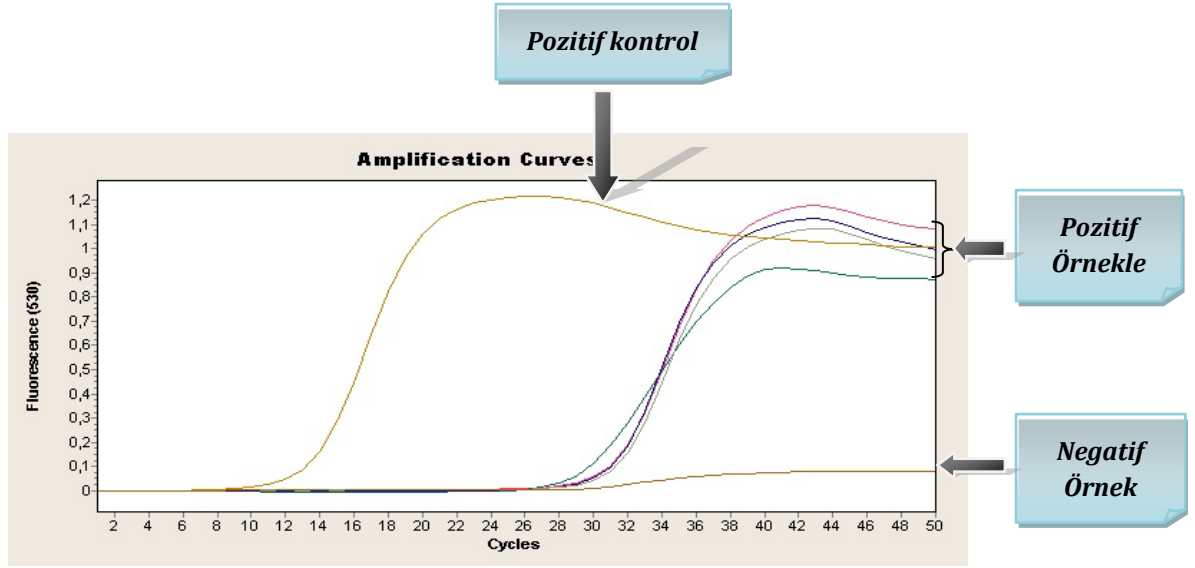
Grafik 4. 4: A ve C grubu tavşanların *C. albicans* amplifikasyon eğrileri (kan örnekleri)



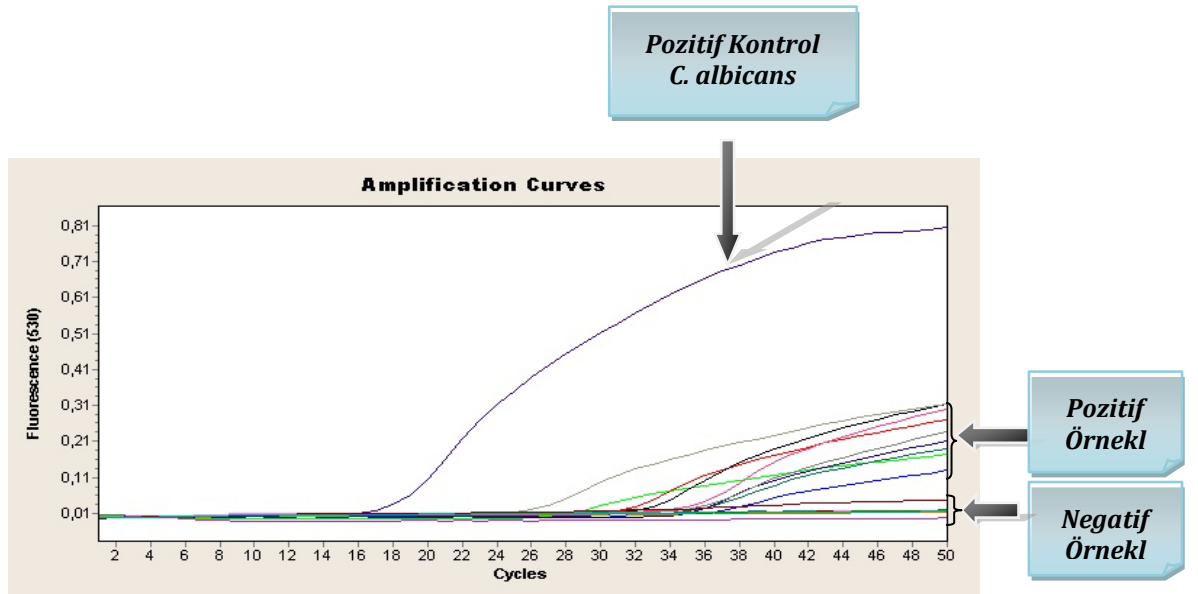
Grafik 4. 5: B grubu tavşanların *S. aureus* amplifikasyon eğrileri (kan örnekleri)



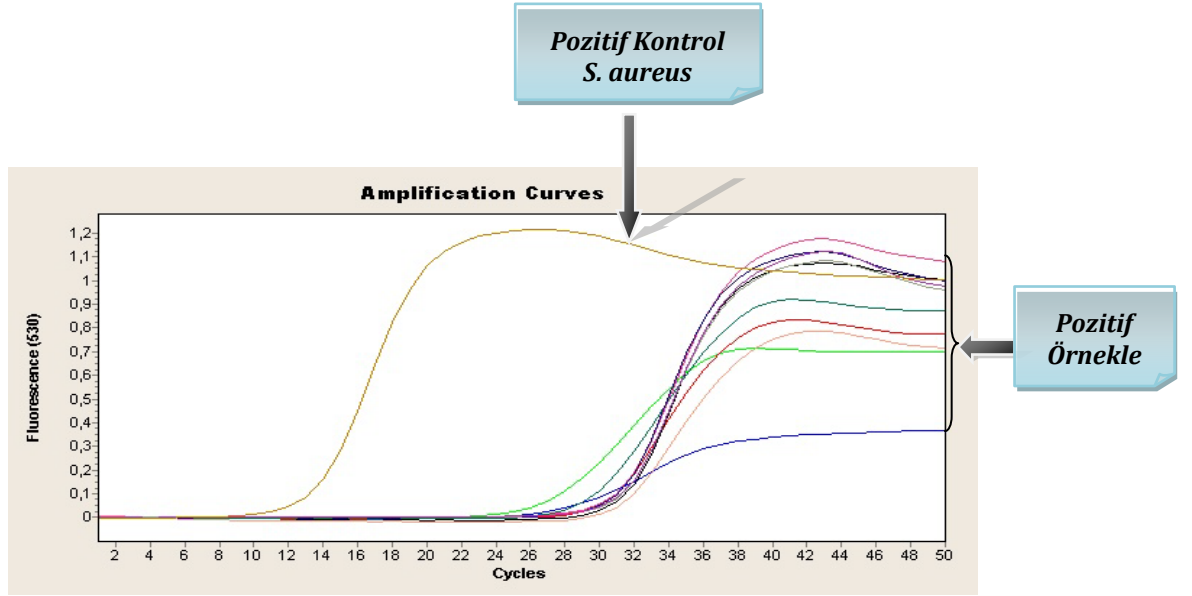
Grafik 4. 6: C grubu tavşanların *S. aureus* amplifikasyon eğrileri (kan örnekleri)



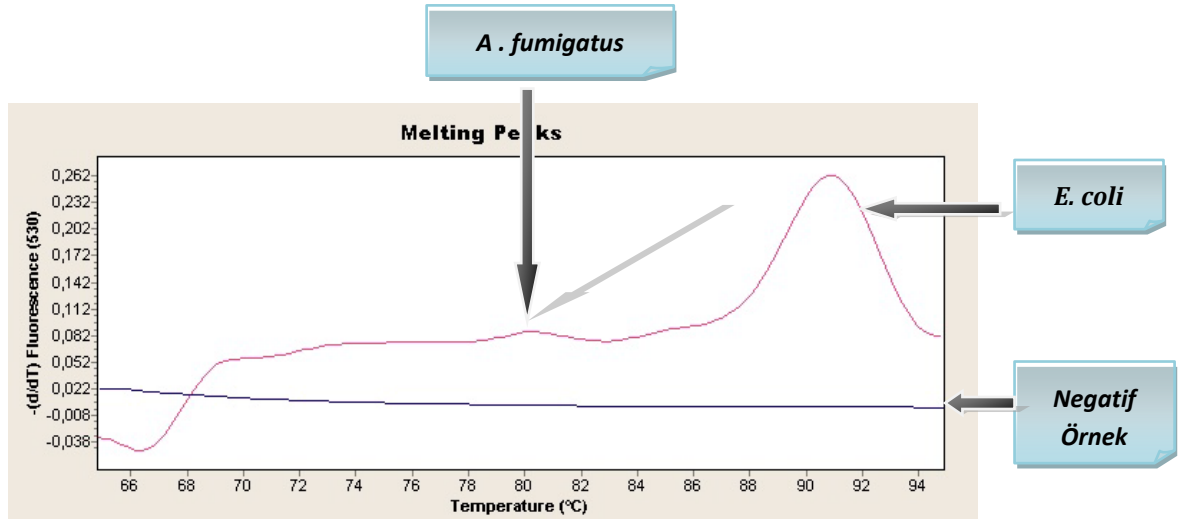
Grafik 4. 7: B ve C grubu tavşanların *E. coli* amplifikasyon eğrileri (kan örnekleri)



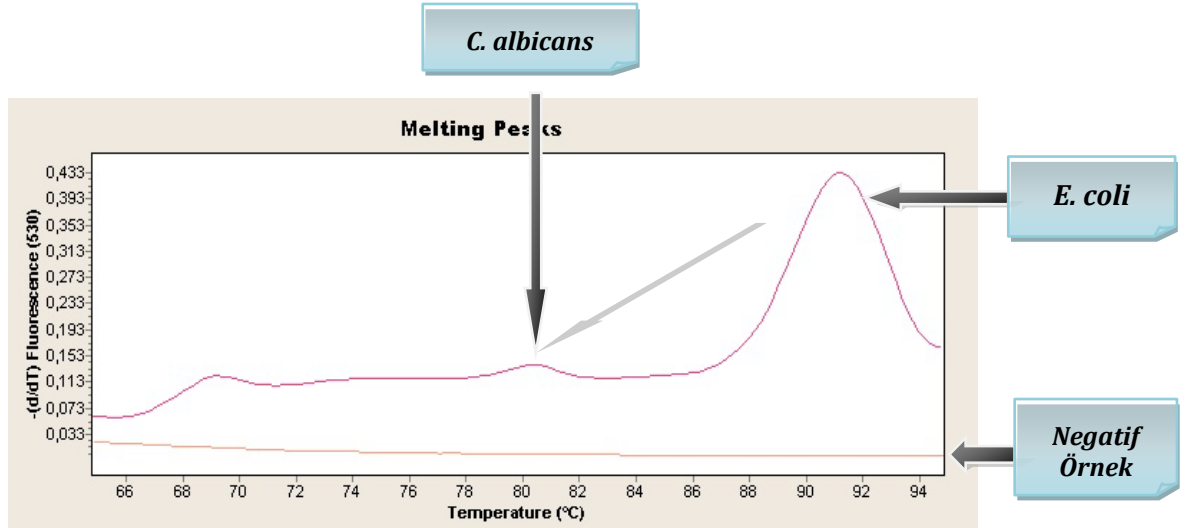
Grafik 4. 8: A ve C grubu tavşanların (*C. albicans* ve *A. fumigatus*) amplifikasyon eğrileri (doku örnekleri)



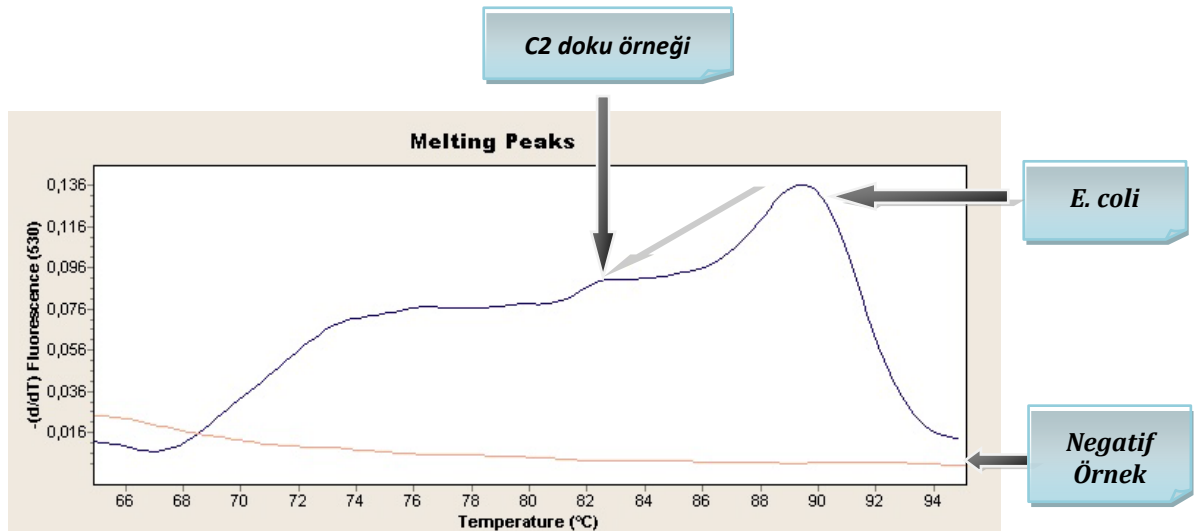
Grafik 4. 9: B ve C grubu tavşanların (*E. coli* ve *S. aureus*) amplifikasyon eğrileri (doku örnekleri)



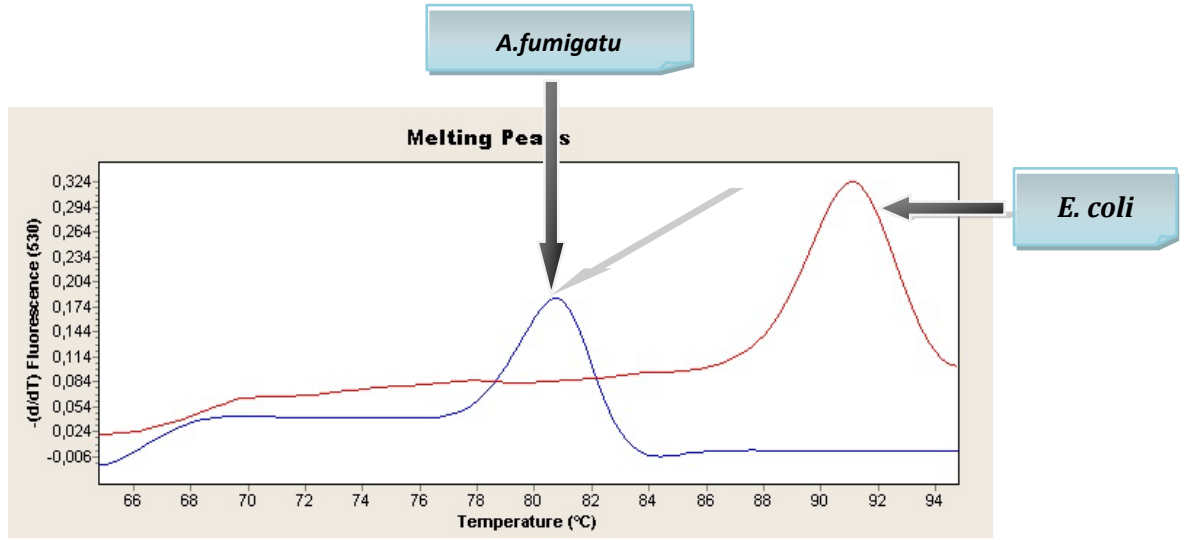
Grafik 4. 10: Çok hedefli (*E. coli* ve *A. fumigatus*) PZR amplifikasyon eğrileri (kan örneği)



Grafik 4. 11: Çok hedefli (*E. coli* ve *C. albicans*) PZR amplifikasyon eğrileri (kan örneği)



Grafik 4. 12: Çok hedefli (*E. coli* ve C2 doku örneği) PZR amplifikasyon eğrileri.



Grafik 4. 13: Çok hedefli (*E. coli* ve *A. fumigatus*) PZR amplifikasyon eğrileri.

5. TARTIŞMA

Sepsis, tanısında zorluklarla karşılaşılabilen, mortalitesi yüksek bir süreçtir. Sepsise neden olan etiyolojik etkenlerin tanımlanmaları için doğru tanısal testler önemlidir. Konvansiyonel mikrobiyolojik kültürler zaman alıcıdır ve bazen sepsis olgularında negatif sonuçlar verebilmektedir. Dolayısı ile moleküler temelli teknolojiler rutin klinik laboratuvarlarda kullanım açısından umut verici testler olarak değerlendirilmektedir.⁸³

Moleküler yöntemler, kan örneklerinde bulunabilen az miktardaki bakteriyel ve fungal DNA'yı saptayabilmektedir. Sepsis etkenlerini saptamak için yüksek duyarlılık ve özgünlük özellikleri gereklidir. Teknik sınırlamalara rağmen, bu genotipik testler geleneksel mikrobiyolojik tanımlar ile birlikte kullanıldığında yararlı olabilmektedir.⁸⁴

Gelişmekte olan bu tür teknikler için klinik değerin ve maliyet etkinliğinin değerlendirilmesi gerekir. Yine de, moleküler yöntemlerin, kan dolaşım enfeksiyonlarının tanısında kullanılan konvansiyonel mikrobiyolojik tekniklerin yerini alması beklenmektedir.⁸³

Bu çalışmada, deneysel hayvan modellerinde oluşturulan sepsise PZR ile tanı konulması amaçlanmıştır. Bakteriyel ve fungal sepsis varlığında veya birden fazla etkenin bulunduğu polimikrobiyal olgularda PZR testinin değeri araştırılmıştır.

Gerçek zamanlı PZR uygulanan sepsisli doku örneklerinde etkenler tanımlanabilmiş, kan örneklerinde ise bazı kısıtlamalar ile karşılaşılmıştır.

Benzer çalışmalar incelendiğinde sonuçların kullanılan yöntemle göre değişiklik gösterdiği ancak genel olarak PZR testinin sepsis tanısında yararlı olduğu görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada; sepsisli tavşanlardan (ölü ve canlı) elde edilen toplam 25 kan örneğinde;

A ve C gruplarındaki toplam 21 kan örneğinde; *Aspergillus* PZR' da 10 tane (%47.61) ve *Candida* PZR' da ise altı tane (%28.57) pozitif sonuç elde edilmiştir.

B ve C gruplarından alınan toplam 10 kan örneğinde; *S. aureus* verilen tüm örneklerde gram pozitif PZR (%100) pozitif, *E. coli* verilen örneklerinin altı tanesinde gram negatif PZR (%60) pozitif bulunmuştur.

Kan örneklerinin PZR ile negatif çıkması DNA kaybına bağlanmıştır.

Toplam 36 sepsisli doku örneğinde; A ve C gruplarındaki toplam sekiz dalak örneğinde *Aspergillus* PZR'da tüm örnekler (%100) pozitif, *Candida* PZR'da ise üç örnek (%37.5) pozitif bulunmuştur.

A ve C gruplarındaki toplam sekiz böbrek örneğinin tümünde *Aspergillus* PZR (%100) pozitif saptanırken, *Candida* PZR ise bir örnekte (%12.5) pozitif saptanmıştır.

Aynı grupların sekiz karaciğer örneğinde, *Aspergillus* PZR tüm örneklerde (%100) pozitif bulunurken, *Candida* PZR üç örnekte (%37.5) pozitif saptanmıştır.

Aspergillus ve *Candida* PZR' sinde pozitiflik oran %64.58 bulunmuştur.

A ve C Doku örneklerinin %35.42 *Aspergillus* ve *Candida* PZR ile negatif çıkması DNA kaybına bağlanmıştır.

Aynı doku örneklerine ayrıca gram negatif ve gram pozitif PZR uygulanmıştır.

B ve C gruplardaki toplam sekiz dalak örneğinde beş örnekte (%62.5) *S. aureus* DNA'sı pozitif gözlenirken, dört örnekte (%50) *E. coli* DNA' sı pozitif saptanmıştır.

Yine bu iki gruptaki toplam sekiz böbrek örneğinin ikisinde (%25) *S. aureus* DNA'sı pozitif iken, dört örnekte (%50) *E. coli* DNA'sı pozitif bulunmuştur.

Son olarak ise 8 karaciğer örneği PZR ile çalışılmış ve dört örnekte (%50) *S. aureus* pozitifken, beş örnekte (%62.5) ise *E. coli* pozitif gözlenmiştir.

B ve C Doku örneklerinin %50.01 gram pozitif ve gram negatif PZR ile negatif çıkması DNA kaybına bağlanmıştır.

Sağlıklı kontrol gruplarının doku ve kan örneklerine uygulanan gerçek zamanlı PZR sonucunda hiçbir örnekte bakteri veya mantar DNA' sı saptanmamıştır

Davis ve arkadaşları kan kültüründeki bakteri izolatlarının bir DNA probu kullanarak direkt tanımlanması adlı çalışmalarında; AccuProbe'u (Gen-Probe, San Diego, Calif) kullanarak pozitif kan kültür şişelerinden *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* türleri ve *Streptococcus agalactiae* gibi mikroorganizmaların hızlı, direkt tanımlanmalarını amaçlamışlardır. Hedef organizmaların rRNA'larını saptamak için kemoluminesans DNA probu kullanmışlardır. Klinik santrifüj tekniği ile bakteri peletleri hazırlanmıştır. Peletlerde AccuProbe ile toplam 196 klinik örneği tanımlamışlar, ancak hibridizasyonu göstermek için negatif kontrol olarak kullanılan 166 örnekte başarısız olmuşlardı. Mikrosantrifüj tekniği ile 105 hasta örneğinden elde edilen peletlerin hepsini tanımlayabilmişlerdir.⁸⁵

Einsele ve arkadaşları moleküler problemler kullanarak kandaki fungal patojenlerin saptanması ve tanımlanması adlı çalışmalarında; *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin saptanması ve tanımlanması için bir PZR

yöntemi geliştirmişlerdi. Primer çifti ve türlere özgül probler kullanarak çeşitli fungal patojenlerin 18S rRNA gen dizilerini karşılaştırarak, türler tanımlamışlardır. Bu yöntemin duyarlılığını ve özgüllüğünü 134 fungal ve 85 fungal olmayan izolat ile test etmişlerdir. Ayrıca amplifikasyonun bütün küf ve mayalar için %100 duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, tanımladıkları bu PZR yöntemi ile fungal patojenlerin, hem in vivo hem de in vitro olarak yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte saptandığını ve tanımlandığını öne sürmüşlerdir.⁸⁶

Mancini ve arkadaşları, hematolojik maligniteli nötropenik hastalarda, sepsisin moleküler tanısı adlı çalışmalarında; yeni bir ticari gerçek zamanlı PZR yöntemi (LightCycler SeptiFast; Roche Molecular Systems) ve kan kültürü kullanarak hematolojik onkolojik hastalardan aldıkları kan örneklerini test etmişlerdir. Çalışmanın kapsamında toplam 103 örnekten 21 örnek (%20.4) kan kültüründe ve 34 örnek (%33) PZR’da pozitif bulunmuştur. Örneklerin, kan kültüründe negatif fakat moleküler yöntemler ile pozitif gözlenmelerinden dolayı bu iki yaklaşım arasında, uyum analizi yaptıklarında düşük bağlantı (%83) olduğunu göstermişlerdir.⁸⁷

2009 yılında Wellinghausen ve arkadaşları, universal 16S rRNA geni kullanarak tam kan örneklerinde bakteriyeminin tanısı için PZR ve dizi analizi yapmışlardır. SİYS, sepsis ya da nötropenik ateşli 187 hastadan 342 kan örneğinde bakteriyeminin hızlı tanısı için bir ticari PZR (SeptiTest; Molzym) testini değerlendirmişlerdir. Bu test, 16S rRNA PZR pozitif örneklerden, dizi analizi ile bakterilerin tanımlamasını içermektedir. Kan kültürü ile karşılaştırıldığında PZR’ın tanısal duyarlılığını %87.0 ve özgüllüğünü %85.8 bulmuşlardır. Çalışmanın sonunda SeptiTest ile bakterilerin hızlı saptanmasının mümkün olduğunu göstermişlerdir.⁸⁸

Çin’de Wu ve arkadaşları, yenidoğanlarda bakteriyel sepsisin tanısı için gram pozitif veya negatif prob ile gerçek zamanlı PZR (GSPBRT) uygulamışlardır. Toplam 53 klinik kökenden 25’ini gram pozitif ve 28’ini gram negatif olarak belirlemişler ve bu türlerin gram prob ile ayrılabilceğini kanıtlamışlardır. Gram-spesifik prob temelli gerçek zamanlı PZR (GSPBRT) yöntemini sepsis şüphesi olan yenidoğanlardan alınan 600 kan örneğinde değerlendirmişler ve kan kültür sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Kan kültürünün pozitiflik oranı %5.67 (34/600) bulunurken, GSPBRT-PZR yöntemin pozitiflik oranı %8.33 (50/600) bulmuşlardır.⁸⁹

GSPBRT-PZR yönteminin bakteriyel enfeksiyonların hızlı ve kesin tanısında faydalı bir yöntem olduğu ve yenidoğanların tedavisinde gereksiz antibiyotik kullanımını engelleyebileceği düşünülmüştür.⁸⁹

Yaptığımız çalışmada bu makalenin bakteri primer ve prob dizileri kullanılmıştır.

2009 yılında Fransa’da Zhao ve arkadaşları, fungal ve bakteriyel kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının saptanmasında moleküler işaret platformu adlı çalışmalarında; tıbbi açıdan önemli olan kan dolaşımı enfeksiyonu etkenlerinin hızlı tanısı için RNA-bağımlı nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon ve moleküler işaretleme (NASBA-MB) kombinasyonundan oluşan bir mltipleks formatı geliştirmişlerdir. Pan-gram negatif, pan-gram pozitif, pan-fungal, pan-*Candida* ve pan-*Aspergillus* hedefleri çoğaltan primer ve problemler kullanmışlardır. Bu platformun doğruluğunu değerlendirmek için kan kültür şişesi kullanan üçüncü basamak hastanelerden 570 klinik örnek toplanmıştır.

Pan-gram pozitif ve pan-gram negatif problemler için tahmine dayalı pozitif ve tahmine dayalı negatif değerleri 100, 90.7, ve 99.4, 99.4 bulmuşlardır. Múltipleks panellerindeki tüm problemler için güçlü sinyaller gözlemişlerdir.⁹⁰

Bingold ve arkadaşları ağır sepsiste kan dolaşımı enfeksiyon etkenlerinin gerçek zamanlı PZR ile saptanmasını araştırdıkları çalışmada; 108 hastadan alınan 453 kan örneğini SeptiFast® Lys kiti, SeptiFast® Prep kiti ve LightCycler® SeptiFast kiti ile incelemişlerdir. PZR sonuçlarını kan kültür sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Sonuçlara bakıldığında PZR'ın pozitiflik oranının kan kültüründen iki kat daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (114'e karşı 58 pozitif örnek). Ayrıca 18 örnekte PZR ve kan kültür sonuçlarının farklı olduğunu gözlemişlerdir. PZR yöntemi ile klasik kan kültürünü karşılaştırdıklarında, duyarlık ve özgüllüğü sırasıyla %69 ve %81 bulmuşlardır.⁹¹

Gebert ve arkadaşları MolYsis kullanarak kan kültür şişelerindeki patojenlerin gerçek zamanlı PZR ile saptanması için bir çalışma yapmışlardır. Bu yöntemin sepsisli hastaların prognozunu artırabildiğini ve uygun antimikrobiyal tedavi için olanak sağladığını öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada türe ve cinse özgül gerçek zamanlı PZR kullanmışlardır. Bu çalışmada pozitif kan kültürü olan 18 örneğin dışında, 11 örnekte hastalığa neden olan organizmayı saptamayı başarmışlardır. Ayrıca kültürü negatif olan 83 örneğin dışında, altı örneğin PZR sonucunu pozitif göstermişlerdir. Çalışmanın sonunda MolYsis ile DNA'nın hazırlanması ve PZR analizi ile kan kültüründeki patojenlerin hızlı saptanmasının mümkün olduğunu belirlemişlerdir.⁹²

Chan ve arkadaşları erken doğan bebeklerde kantitatif PZR ile gram negatif ve gram pozitif bakteriyel kan dolaşımı enfeksiyonlarını hızlı bir şekilde tanımlamışlardır. Toplam 218 enfeksiyon şüpheli epizodu araştırmışlardır. Bunlardan, 42 epizodun kültürünü pozitif ve 176 epizodun kültürünü negatif bulmuşlardır. 22 epizottan 19 tanesini gram negatif enfeksiyon olarak, 19 epizottan 14 tanesini gram pozitif enfeksiyon olarak tanımlamışlardır. Geri kalan bir epizodun ise *Candida albicans* sepsisi olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda kan dolaşımı ve karın içi enfeksiyonlardaki gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmaların hızlı tanımlanması ve ayırt edilmesi için kullanılan grama özgül kantitatif PZR testinin güvenli ve özgül olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu test hastalığa neden olan organizmanın virölansını tahmin edilebilmekte, ve böylece hastalarda tedavinin şeklinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır.⁹³

2005 yılında Shang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 16S rRNA genini amplifiye etmiş ve mikroarray ile bakterilerin hızlı tanısını yapmışlardır. Sepsis şüphesi olan 172 olgu için PZR–Mikroarray analizi ve kan kültürünü karşılaştırmışlardır. Primer ve proplar, bakteriyel 16S rRNA gen dizisi esas alınarak mikroarray slaytlarında dizilmiştir. PZR ile 172 klinik olgunun 17'sini pozitif bulmuşlardır. PZR'nun pozitiflik oranı %9.88 bulunurken, kan kültürünün pozitiflik oranı %4.65 bulunmuştur. Kan kültürünü kontrol olarak kullandıklarında PZR'ın duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %97.85 bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan yöntem ile klinik örneklerde bakteriyel 16S rRNA'ların saptanabileceğini yenidoğan sepsis tanısında kullanılabildiğini, bu yöntemin kan kültüründen daha yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte çalıştığını öne sürmüşlerdir.⁹⁴

Fransa'da 2009 yılında Khlif ve arkadaşları kandidemi tanısında nested ve gerçek zamanlı PZR yöntemlerini değerlendirdikleri çalışmada; kan dolaşımı enfeksiyonlarındaki *Candida* türlerinin tanısı için gerçek zamanlı PZR ve nested PZR ile kan kültürünü karşılaştırmışlardır. Sistemik mantar enfeksiyonu riski taşıyan 110 hastadan toplam 200 klinik örnek elde etmişlerdir. Gerçek zamanlı PZR iki şekilde yapılmıştır; birincisine *Candida* cinslerine özgül gerçek zamanlı PZR (*can-G*) adını vermişler, diğerine ise *Candida* türlerine özgül gerçek zamanlı PZR (*can-S*) adını vermişlerdir. Yöntemde TaqMan problemleri kullanmışlardır.⁹⁵

Yanlış pozitif sonuçlara neden olabilecek kontaminasyon riski engellendiğinde ve PZR aşamalarındaki zaman kaybını önleyen gerçek zamanlı PZR yapıldığında, kan dolaşımdaki *Candida* türlerinin tanısı için nested PZR yönteminin uygun olduğu gözlenmiştir.⁹⁵

Avustralya'da Lau ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, doku örneklerinde fungal DNA'nın saptanması ve tanımlanması için panfungal PZR yöntemi uygulanmış, fungal DNA'yı saptamak için , rDNA dizisinin ITS1 (internal transcribed spacer 1) bölgesini hedefleyen bir panfungal PZR testi geliştirilmiştir. İnvaziv fungal enfeksiyonlara neden olan patojeni tanımlamak için PZR sonuçları dizilenmiş ve gen bankasındaki diziler ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Exophiala*, *Exserohilum*, *Apophysomyces*, *Actinomucor* ve *Rhizopus* türleri tanımlanmıştır. Çalışmanın sonucunda doku örneklerindeki mantarların kesin tanısı için klasik laboratuvar testleri ile birlikte panfungal PZR yönteminin kullanılması önerilmiştir.⁹⁶

Sepsise neden olan patojenlerin hızlı saptanmaları için gerçek zamanlı PZR yönteminin yanı sıra çok hedefli (mültipleks) PZR yöntemi de kullanılmaktadır. Çok hedefli PZR yöntemi, kültürlerde tespit edilemeyen patojenlerin kandan nükleik asit amplifikasyonu ile DNA'larını saptayabilmektedir. Bu yöntem, hastalığa neden olan patojenleri hızlı saptayabildiği için, sepsisin erken tanısını, hızlı ve doğru antimikrobiyal tedaviye başlanmasını sağlar ve böylece sepsisten kaynaklanan mortaliteyi azaltabilir.

Çok hedefli PZR yöntemi ile yapılan çalışmaların çoğunda SeptiFast testi (LightCycler SeptiFast assay; Roche; Germany) kullanılmaktadır. Bu test gram pozitif, gram negatif ve mantar olmak üzere 25 patojenin DNA'larını saptayabilmektedir.

Tablo 5.1: Çok hedefli PZR yöntemi olan, ticari SeptiFast kiti ile tanımlanan mikroorganizmaların listesi.⁹⁷

Gram pozitif bakteriler	Gram negatif bakteriler	Mantar
Koagülaz negatif stafilokoklar ¹ <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus sp.</i> ²	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacter aerogenes/ cloacae</i> ³ <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae/ oxytoca</i> ³ <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i>

1. *Staphylococcus hemolyticus, epidermidis*= Koagülaz negatif stafilokoklar
2. *Streptococcus agalaciae, pyogenes, viridans*= *Streptococcus sp*,
3. Bu iki alttür arasında hiçbir fark yoktur.

SeptiFast testi hastalığa sebep olan mikroorganizmanın altı saat içerisinde hızlı tanımlanmasını sağlayabilirken, kan kültürlerinin gram boyama sonuçları iki gün, türlerin tanımlanması üç günde tanımlanabilmektedir.⁹⁸

Daha çok Avrupa ülkelerinde kullanılan bu test pahalı bir testtir. Test başı maliyeti 200-250 Avro olarak hesaplamaktadır. Ayrıca kullanması için üstün teknik yetenek gerekmektedir. Örneklerin işlenmesi aşamasında kolaylıkla kontamine olduğu ve bu nedenle ayrı bir mekan gerektiği bildirilmiştir. Öte yandan mikroorganizmalarının antimikrobiyallere duyarlılıkları ile ilgili bilgi sağlayamamaktadır. Tedavi öncesi kan kültürü negatif olan ve ampirik antimikrobiyal tedavi başlanmış hastalarda, sepsisin hızlı etiyolojik tanısı için SeptiFast testi klinik uygunluğundan dolayı konvansiyonel kültür yöntemlerine ilave edilmiştir.⁹⁸

Bu ticari sistem pahalı olduğu için avantajlarına rağmen yaygın kullanılmamaktadır. Bu ticari sisteme benzeyen laboratuvar içi (in-house) protokoller bildirilmiştir.

2010 yılında Wallet ve arkadaşları bu ticari multiplaks sistemi (LightCycler SeptiFast (LC-SF) test; Roche Diagnostic) kullandıkları çalışmalarında; cins düzeyinde dört, tür düzeyinde 16 patojeni hedeflemişlerdir. Şüpheli sepsis nedeni ile altı aydan fazla yoğun bakım ünitesinde kalan 72 hastadan 100 kan kültürü ve LC-SF sonuçlarını elde etmişlerdir. LC-SF testi olguların %15'inde bakteriyemi ve fungemi DNA'ları saptanırken, kan kültürlerinin pozitiflik oranı %10 bulunmuştur. LC-SF sonuçlarına göre; sekiz hastanın başlangıç tedavileri yetersiz olduğundan antibiyotik tedavileri değiştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda

LightCycler SeptiFast (LC-SF) testinin, sepsis şüpheli hastaların tedavilerinin düzenlenmesinde değerli bir tamamlayıcı araç olabileceği belirlemişlerdir.⁹⁹

Louie ve arkadaşları bakteriyemi ve fungemi tanısında birçok organizmanın eşzamanlı saptanmasını sağlayan mltipleks PZR yöntemini test etmişlerdir. Acil servise gelen hastalar, yoğun bakım üniteleri ve kan dolaşımı enfeksiyonu riski olan genel tıp servisleri ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SİYS) belirtileri gösteren hastalardan 200 erişkin (>18 yaş) seçilmiştir. PZR testleri ve kan kültürü için tam kan örnekleri toplamışlardı. PZR sonuçları, kan ve diğer kültür sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Gram negatif ve gram pozitif bakteriler için 16S ve 23S rDNA ve mantarlar için 18S ve 5.8S rDNA bölgeleri amplifiye edilmiştir. Ayrıca hedefe özgü ve floresan ile işaretlenmiş problr kullanılarak SeptiFast ile mltipleks PZR çalışmışlardır. PZR sonuçlarını 37 kan kültürü sonucu ile karşılaştırdıkları zaman, PZR'ın 45 olguda önemli bakterileri ve mantarları saptadığını gözlemlemişlerdir. Kan, idrar ve kateter kültürleri ile PZR sonuçlarının %68' den fazlasının doğru olduğunu kanıtlamışlardır. Çalışmanın sonucunda kan kültürü ile saptanamayan bakteri ve mantarların mltipleks PZR yöntemi ile anlamlı bir şekilde saptandığı belirtilmiştir.¹⁰⁰

Almanya'da 2009 yılında Dierkes ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sepsis şüpheli hastalarda patojenlerin hızlı saptanması için ticari mltipleks PZR sisteminin klinik önemini analiz etmişlerdir. Sepsis şüpheli hastalardan alınan kan örnekleri Bactec 9240TM (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) sistemi ile kültüre edilmiş ve aynı örnekler LightCycler SeptiFast testi ile analiz edilmiştir. 77 hastadan alınan 101 kan örneğinin 63' ünde (%62) negatif, 14' ünde (%13) pozitif sonuçlar

elde edilmiş ve dokuzunda (%9) sadece kan kültürü pozitif sonuç vermiştir. 14 örneğin (%13) patojenleri sadece SeptiFast ile saptanmış ve beş hastada (hastaların %77) antibiyotik tedavisinin düzeltilmesi ile sonuçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda konvansiyonel kan kültürlerine ek olarak mültepleks PZR'ın da sepsis şüpheli hastalar için kliniğin yönlendirilmesinde önemli olduğu görülmüştür.¹⁰¹

Westh ve arkadaşları mültepleks gerçek zamanlı PZR ve kan kültürü yöntemlerini kullanarak şüpheli sepsis hastalarında kan dolaşımı patojenlerinin tanımlanması amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Mültepleks PZR (SeptiFast alpha version) testi kullanarak 20 bakteri ve mantar türünü tanımlamaya çalışmışlardır. Kan kültürü ve SeptiFast testi için toplam 359 hastadan 558 örnek elde etmişlerdir. Kan kültürün pozitiflik oranı %17 ve SeptiFast testin pozitiflik oranı %26 bulunmuştur. Kan kültürlerden 96 mikroorganizma izole edilmiş, ve 186 mikroorganizma SeptiFast ile tanımlanmış ve 231 mikroorganizma iki testin kombinasyonu ile tanımlanmıştır. Kan kültür ile tanımlanan 96 izolatin, 22'sinin kontamine olduğu kabul edilmiştir. Geri kalan 74 izolatin, 50'si (%68) hem kan kültürü hem de SeptiFast ile saptanmıştır. Kan kültürü pozitif fakat SeptiFast testi negatif olan 24 izolatin altısının SeptiFast ile saptanan mikroorganizmalar listesinde olmadıkları, 18 izolatin ise listede oldukları görülmüştür. Çalışmanın sonucunda SeptiFast ile 186 mikroorganizma tanımlanmış ancak bunlardan 12'si kontamine olarak kabul edilmiştir.¹⁰²

Bütün bu çalışmalardan anlaşılacağı üzere, sepsis tanısında kültür yöntemleri yetersiz kalabilmekte, bu nedenle tek hedefli veya çok hedefli PZR sistemleri tanıda umut vaat etmektedir. Moleküler temelli yöntemlerin sepsis tanısı için kullanılmaya başlanması ile, şüpheli ama

tanı konamayan olgularda ampirik antimikrobiyal tedavi yapılmasına gerek kalmayacak, önemli maddi kaynak kazanılmış olacaktır.

Bütün bu çalışmalardan anlaşılacağı üzere, sepsis tanısında kültür yöntemleri yetersiz kalabilmekte, bu nedenle tek hedefli veya çok hedefli PZR sistemleri sepsis tanısında umut vaad etmektedir.

Çalışmamızda örneklerin büyük kısmında pozitiflik sağlayan bir moleküler yöntem geliştirilmiştir.

DNA kayıpları DNA eldesinde kullanılan basmakların geliştirilmesi ile düzeltilecektir.

Moleküler yöntemler özellikle polimikrobiyal olgularda etkenleri tek tek tanımlamada teknolojik destek sağlamaktadır. Bu nedenle sepsis tanısında nükleik asit saptanmasına dayalı yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanımlarının yaygınlaştırılması, gelecekte yeni tanı sistemlerinin ticari olarak üretilmesine temel oluşturacaktır.

12. SONUÇ

Son yıllarda sepsis etkenlerini saptamak ve tanısını koymak amacıyla moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada ; sepsis oluşturulan deneysel hayvan modellerinde tek veya çoklu etken varlığında gerçek zamanlı PZR yönteminin etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmaya on dört tavşan alınmış ve dört gruba ayrılmıştır. Gruplar A, B, C ve sağlıklı kontrol grubu (S) olarak adlandırılmıştır. A, B ve C gruplarının her birinde dört , kontrol grubunda ise iki adet tavşan bulunmaktadır.

Her gruba (kontrol grubu hariç) farklı mikroorganizma süspansiyonu kulak veninden intravenöz yolla enjekte edilerek sepsis oluşturulmuştur. A grubundaki tavşanlara mantar süspansiyonu; B grubundaki tavşanlara bakteri süspansiyonu, C grubuna ise mantar ve bakteri süspansiyonları eşit oranlarda karıştırarak enjekte edilmiştir. Süspansiyonlar verildikten sonra denekler takibe alınmıştır.

Bu çalışmada, etkenleri saptamak için esas olarak TaqMan probu kullanılan gerçek zamanlı PZR kullanılmıştır. Ayrıca mantar ve bakteri DNA'larını tek çalışmada göstermek amacıyla iki ayrı primer çifti ve SYBR green probunu kullanarak çok hedefli (müльтиpleks) PZR geliştirilmiştir. Aynı zamanda testin özgüllük ve duyarlılığını değerlendirmek ve çalışmada kullanılan primer ve problemlerin etkinliğini belirlemek amacı ile pozitif kontrol olarak koloni süspansiyonları ve kontamine edilen hasta kan örnekleri kullanılmıştır. Sepsisli tavşanlardan

alınan bütün kan ve doku örneklerinde, kültür ile sepsis tanısı doğrulanmıştır.

Tüm gruplardan toplam 27 kan ve 42 doku (dalak, böbrek ve karaciğer) örneği alınmıştır. Bu örneklerden, farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanarak DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'ların miktarı ölçülmüştür. (NanoDrop; Thermo Scientific. ABD)

Deneklerin kan ve dokularından elde edilen DNA'lar hem bakteriyel hem de fungal primerler ve proplar kullanarak çoğaltıldığında, enfekte gruplara intravenöz olarak verilen etkenler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

A ve C gruplarındaki (canlı ve ölü) toplam 21 kan örneğinde; *Aspergillus* PZR' da 10 tane (%47.61) ve *Candida* PZR' da ise altı tane (%28.57)) pozitif olmak üzere %76.1 pozitif sonuç elde edilmiştir.

B ve C gruplarından alınan (canlı ve ölü) toplam 10 kan örneğinde; intravenöz *S. aureus* verilen tüm örneklerde gram pozitif PZR (%100) pozitif, *E. coli* verilen örneklerinin altı tanesinde gram negatif PZR (%60) pozitif olmak üzere %80 pozitif sonuç saptanmıştır.

Kan örneklerinin PZR ile negatif çıkması DNA kaybına bağlanmıştır.

Doku örneklerinde ise, *Aspergillus* ve *Candida* PZR uygulanmış ve pozitiflik oranı %64.58 bulunmuştur.

A ve C gruplarındaki toplam sekiz dalak örneğinde *Aspergillus* PZR'da tüm örnekler (%100) pozitif, *Candida* PZR'da ise üç örnek (%37.5) pozitif bulunmuştur.

A ve C gruplarındaki toplam sekiz böbrek örneğinin tümünde *Aspergillus* PZR (%100) pozitif saptanırken, *Candida* PZR ise bir örnekte (%12.5) pozitif saptanmıştır.

Aynı grupların sekiz karaciğer örneğinde, *Aspergillus* PZR tüm örneklerde (%100) pozitif bulunurken, *Candida* PZR üç örnekte (%37.5) pozitif saptanmıştır.

A ve C Doku örneklerinin %35.42 *Aspergillus* ve *Candida* PZR ile negatif çıkması DNA kaybına bağlanmıştır.

Aynı doku örneklerine ayrıca gram negatif ve gram pozitif PZR uygulanmış ve pozitiflik oranı %49.99 bulunmuştur.

Bu uygulamaya B ve C grupları dahil edilmiştir. Bu iki gruptaki toplam sekiz dalak örneğinde beş örnekte (%62.5) *S. aureus* DNA'sı pozitif gözlenirken, dört örnekte (%50) *E. coli* DNA'sı pozitif saptanmıştır. Yine bu iki gruptaki toplam sekiz böbrek örneğinin ikisinde (%25) *S. aureus* DNA'sı pozitif iken, dört örnekte (%50) *E. coli* DNA'sı pozitif bulunmuştur.

B ve C gruplarındaki 8 karaciğer örneği PZR ile çalışılmış ve dört örnekte (%50) *S. aureus* pozitifken, beş örnekte (%62.5) ise *E. coli* pozitif gözlenmiştir.

B ve C Doku örneklerinin %50.01 gram pozitif ve gram negatif PZR ile negatif çıkması DNA kaybına bağlanmıştır.

Sağlıklı kontrol gruplarının doku ve kan örneklerine uygulanan PZR sonucunda hiçbir örnekte bakteri veya mantar DNA' sı saptanmamıştır.

Buna göre, sepsisin tanısında kullanılan moleküler yöntemler, kan kültürü ile kıyaslandığında daha hızlı sonuç verebilen, özgüllük ve duyarlılığı yüksek testlerdir. Doğru antimikrobiyal tedaviyi sağlayarak, sepsis mortalitesini azaltabilirler. Moleküler yöntemlerin hızla ilerlemesi ile enfeksiyon hastalıklarının yönetiminde ve tanısında önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca çok hedefli PZR yöntemi ile bakteriler veya mantarlardan seçilecek bölgelerin gösterilmesi ile kültür sonuçlarından önce polimikrobiyal sepsis tanısının koyulması mümkün olabilecektir. Çok avantajlı ve ekonomik olan bu yöntemin rutin tanıya girebilmesi için çok sayıda örneğin tekrar tekrar tarandığı geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. ÖZET

DENEYSEL SEPSİS MODELLERİNDE GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE ETKENLERİN SAPTANMASI

Sepsis, tedavide ciddi problemler oluşturan ve yüksek mortaliteye neden olan bir hastalıktır. Sepsisin erken tanısı için araştırma yapmak hızlı tanısı için değerlidir. Sepsisin erken ve çabuk tanısını için PZR yöntemi kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, enfeksiyon etkenlerini tek tek veya polimikrobiyal şeklinde saptamak için gerçek zamanlı PZR kullanılmıştır.

Bu çalışmada toplam 14 tavşan kullanılmış ve A, B, C ve sağlıklı kontrol grubu S olarak dört gruba ayrılmıştır. *C. albicans* ATCC 10231 ve *A. fumigatus* ATCC 204305 A grubu tavşanlara, *E. coli* ATCC 10536 ve *S. aureus* ATCC 6538 B grubu tavşanlara, kulak veni yolu ile enjekte edilmiştir. C grubu tavşanlara ise eşit oranlarda mantar ve bakteri süspansiyonları enjekte edilmiştir. Sağlıklı kontrollere ise hiçbir mikroorganizma enjekte edilmemiştir.

Kan ve doku örnekleri kültüre edilmiş ve tüm çalışma gruplarında pozitif bulunmuştur. Tavşanların kan ve doku örneklerinden DNA'lar elde edilmiştir.

Özgöl primer ve proplar kullanarak, fungal ve bakteriyel sepsisin varlığı PZR yöntemi ile doğrulanmıştır.

Ayrıca SYBR green ve erime eğirisi (Melting curve) kullanılarak çok hedefli PZR yöntemi gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin çoğunda patojenler saptanmış, kontrol gruplarında ise negatif bulunmuştur.

sepsisin tanısında kullanılan moleküler yöntemler, kan kültürü ile kıyaslandığında daha hızlı sonuç verebilen, özgüllük ve duyarlılığı yüksek testlerdir.

Anahtar Sözcükler: Bakteri, Gerçek zamanlı PZR, Mantar, Sepsis, SYBR green, TaqMan

8. SUMMARY

USING REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) FOR DETECTION OF AGENTS IN THE EXPERIMENTAL SEPSIS MODELS

Sepsis is a disease that cause serious problems in the treatment and thus it has high mortality rates. Early diagnosis of sepsis is worth of research, in order to provide rapid diagnosis. PCR methodology is used for early and prompt diagnosis of sepsis.

In our study, Real-Time PCR was used for the detection of infectious agents individually or in polymicrobial form.

In this study 14 rabbits were used and divided into four groups, as; A, B, C and healthy control groups. *C. albicans* ATCC 10231 and *A. fumigatus* ATCC 204305 were injected into A group rabbits, while *E. coli* ATCC 10536 and *S. aureus* ATCC 6538 were injected into B group rabbits. Injections were performed by the ear ven. Equal proportion of fungi and bacteria suspension was injected into C group of rabbits. None of the microorganism injected into healthy controls.

Blood and tissue samples were cultured and were found positive in all working groups. DNA samples were extracted from blood and tissue samples of the rabbits.

Using specific primers and probes, the presence of fungal and bacterial sepsis was confirmed by TaqMan PCR. An additional multiplex PCR assay was performed using SYBR green and melting curve analysis.

Pathogens were detected in most of the samples, while control groups were found negative.

Molecular methods that used in the diagnosis of sepsis when compared with blood culture, can be provide more rapid results, specificity and sensitivity of these tests are high.

Keywords: Bacteria, Fungi, Sepsis, Real-Time PCR, SYBR green, TaqMan

9. KAYNAKLAR

1. Lebel M, Tapiero B. Bacteremia, Sepsis and Septic Shock. In: Jenson HB, Baltimore RS, editors. Pediatric Infectious Diseases. 2nd edition. Philadelphia: WBSaundersCompany; 2002. p.279-295
2. Butt W. Septic shock. Pediatr Clin North Am 2001; 48: 601-625
3. Bone RC. Pathophysiology of sepsis. Ann Intern Med 1991; 115(6): 457-469
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Chest 1992; 101: 1644-1655
5. Tabak F. Sepsis ve Septik Şok. Prognoz 1999; 2: 178-184
6. Kocagöz S, Ünal S. Giriş ve Genel Bilgiler. içinde: Uzun Ö, editör. Sepsis ve Sekelleri. HÜTF Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi 1996:1-5
7. Zanetti G, Baumgartner JD, Glauser MP. Bacteremia, sepsis and septic shock. In: Root RK, Corey WL, Stamm WE, editors. Clinical Infectious Diseases-A Practical Approach. New York: Oxford University Press;1999.p.471-482.
8. Pourcyrous M, Korones S, Bada H, Patterson T, Baselski V. Indwelling umbilical arterial catheter: A preferred, sampling site for blood culture. Pediatrics 1988; 81(6): 821-825

9. Bahar M. Sepsis patofizyolojisi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi 2006; 51: 11–15

10. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 29: 530-538

11. Kurt C. Sepsis ile ilişkili Tanımlar, Epidemiyoloji, İnsidans ve Klinik. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi 2006; 51: 17 –26

12. Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. Crit Care Clin 2000;16(2):179-192.

13. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003; 348(16): 1546-1554

14. Uzun O, Akalin HE, Hayran M, Unal S. Factors influencing prognosis in bacteremia due to gram negative organisms: evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital. Clin Infect Dis 1992; 15(5): 866-873

15. Bilevicius E, Dragosavac D, Dragosavac S, Araujo S, Falcao AL, Terzi RG, et al. Multiple organ failure in septic patients. Braz J Infect Dis 2001; 5(3):103-110.

16. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current Epidemiology of septic shock. The CUB-Rea Network, Am J Respir Crit Care Med 2003; 168(2):165-172

17. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29(7):1303-1310

18. Abraham E, Wunderink R, Silverman H. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. JAMA 1995; 273(12): 934- 941

19. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 1987; 317(11): 653-658

20. Dhainaut JF, Vincent JL, Richard C. CDP 571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor-alpha; safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. CPD 571 Sepsis Study Group. Crit Care Med 1995; 23(9): 1461-1469

21. Sands KE, Bates DW, Lanken PN. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. JAMA 1997; 278(3): 234-240

22. Sibbald WJ, Nevriere R. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: Definitions and prognosis [online]. 2005 [cited 2010 feb 6]. Available from: URL:

<http://www.uptodate.com>

23. Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebocontrolled trial. The HA 1A Sepsis Study Group, N Engl J Med 1991; 324(7): 429-436

24. Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. Arch Intern Med 1994; 154(1): 26-34

25. Kieft H, Hoepelman AI, Zhou W, Rozenberg-Arska M, Struyvenberg A, Verhoef J, et al. The sepsis syndrome in a Dutch University Hospital. Arch Intern Med 1993; 153(19): 2241-2247

26. Martin MA. Epidemiology and clinical impact of gram-negative sepsis. Infect Dis Clin North Am 1991; 5(4): 739-752

27. Weinstein MP, Towns ML, Quartery SM. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s; A prospective comprehensive evaluation of microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997; 24: 584-602

28. Baer SL, Pappas PG. Hematogenously disseminated fungal infections. In: Anaissie JE, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. Clinical Mycology. 2nd edition. London, UK: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p.609 -622

29. Russell JA. Management of sepsis. N Engl J Med 2006; 355(16): 1699-1713.

30. Shanley TP, Hallstrom C, Wong HR. Sepsis. In: Fuhrman BP, Zimmerman JJ, editors. Pediatric Critical Care. 3rd edition. Philadelphia: Mosby; 2006.p.1474-1493

31. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. British Med J 2003; 326(7383): 262-266

32. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003; 348(2): 138-150

33. Yavuz Y. Konjenital kalp cerrahisi sonrasında gelişen sepsiste risk faktörleri. Uzmanlık tezi. İstanbul: Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi; Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği; 2008

34. Majewska M, Szczepanik M. The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation. Postepy Hig Med Dows 2006; 60: 52-63

35. Lynn WA. Sepsis. In: Armstrong D, Cohen J, editors. Infectious Diseases. 1 nd edition. London: Mosby; 1999.p.1-14

36. Young LS. Sepsis syndrome. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 2nd edition. New York : Churchill Livingstone; 1995.p.690-705

37. Harris RL, Musher DM, Bloom K. Manifestation of sepsis. Arch Intern Med 1987;147(11): 1895-1906
38. Hamill RJ, Maki DG. Endotoxin shock in man caused by gram-negative bacilli. In: Proctor RA, editors. Handbook of Endotoxin. 4th edition. Amsterdam: Elsevier; 1986.p.55
39. Martin MA, Silverman HJ. Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. Clin Infect Dis 1992; 14: 1213-1228
40. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Intensive Care Med 2004; 32: 536-555
41. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. Intensive Care Med 2001; 27: 3-9
42. Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. Intensive Care Med 2001; 27: 10-32
43. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. Crit Care Med 2004 ; 32(11): 466-494
44. Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA. Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock. Crit Care Med 2000; 28(7): 2591-2594

45. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling-regulation of the immun response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000; 28(4): 3-12

46. Mitaka C. Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clinica Chimica Acta* 2005; 351(1-2): 17-29

47. Carrol ED, Thomson APJ, Hart CA. Procalcitonin as a marker of sepsis. *Int J Antimicrobial Agents* 2002; 20(1): 1-9

48. Brunkhorst FM, Wegscheider K, Korycki ZF, Brunkhorst R. Procalcitonin for early diagnosis, and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26(15): 148-152

49. Chiesa C, Panero A, Rossi N. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 664-672

50. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 206-217

51. Holzheimer RG. Antibiotic-induced endotoxin release and clinical sepsis. *J Chemother* 2001; 13(1): 159-172

52. Hurley JC. Concordance of endotoxemia with gram-negative bacteremia in patients with gram-negative sepsis: a meta-analysis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(9): 2120-2127

53. Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. J Clin Pharmacol Ther 2001; 26(5): 319-329

54. Angus DC, Burgner D, Wunderink R, Mira JP, Gerlach H, Wiedermann CJ, et al. The PIRO concept : P is for predisposition. Critial Care 2003; 7(3): 248-251

55. Schröder NWJ, Schumann RR. Single nucleotid polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility infectious disease. Lancet Infect Dis 2005; 5(3): 156-164

56. Vincent JL, Opal S, Torres A, Bonten M, Cohen J, Wunderink R, et al. The PIRO concept : I is for infection. Critical Care 2003; 7(3): 252-255

57. Vidaur L, Rodriguez A, Rello J. Antibiotic therapy for sepsis, severe sepsis, and septic shock: The "Tarragona" strategy. In: Vincent JL editor. Year Book of Intensive Care and Emergency Medicine 2004. Berlin: Springer Verlag; 2005.p.229-241.

58. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 444-465

59. Öztürk R. Damar içi kateterlere bağlı enfeksiyonlar ve korunma. İçinde: Doğanay M, Ünal S; editörler. Hastane İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003.s.489-517

60. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296: 1305-1309

61. Aube H, Milan C, Blettery B. Risk factors septic shock in the early management of bacteremia. *Am J Med.* 1992; 93:283

62. Martin MA, Pfaller MA, Wenzel RP. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Ann Intern Med* 1989; 110(1): 9-16

63. Aygen B, Inan M, Doganay M, Kelestimur F. Adrenal functions in patients with sepsis. *Exp Clin Endocrinol Diab* 1997; 105(3):182-186

64. Fourrier F, Chopin C. Goudemand J. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. *Chest* 1992; 101(3): 816-823

65. Pittet DL, Woolson N, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: A 6-year validated, population-based model. *Clin Infect Dis* 1997; 24(6):1068-1078

66. Beşirbellioğlu BA. Hayatı Tehdit Eden Enfeksiyonların Tedavisi: Sepsis. EKMUD Bilimsel Platformu; 2006 Ekim 5-8; Ankara, Türkiye. Ankara: Bilimsel Tıp yayınevi; 2006: 133-137

67. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: A multi-institutional study. *Clin Infect Dis* 2006; 43(1): 25-31

68. Levvis T, Murray P. Pulmonary Defense Against Infection and the Systemic Inflammatory Response: Sepsis and Multisystem Organ Dysfunction. In: Leff AR, editor. Pulmonary and Critical Care Pharmacology and Therapeutics. New York: McGrawv Hill; 199.p.971-986

69. Weikert LF, Bernard GR. Pharmacotherapy of Sepsis. Clin Chest Med 1996; 17(2): 289-306

70. Vincent JL. New Therapies in Sepsis. Chest 1997; 112: 330-338

71. Dinarello CA. Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Septic Shock. Chest 1997; 112(6): 321-329

72. John RC, Dorinsky PM. Immunologic Therapy for ARDS, Septic Shock, and Multiple Organ Failure. Chest 1993; 103(3): 932-943

73. Merz WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller M, Tenover FC, Tenover MC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington: ASM Press. 2003.p.1669-1685

74. Wolcott MJ. Advances in nucleic acid-based detection methods. Clin Microbiol Rev 1992; 5(4): 370-386

75. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004

76. Dolapçı I. In vitro nükleik asit amplifikasyon teknikleri. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Editörler. Moleküler Mikrobiyoloji 1. Baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006

77. Applied Biosystems. Real- Time PCR vs. Traditional PCR [online]. 2008 [cited 2010 Feb 4]. Available from: URL:

http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.preg.html

78. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. Türk Klin J Med Sci 2007; 27: 763-767

79. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Tanısal moleküler mikrobiyoloji teorik ve uygulamalı kursu, Teorik ders notları. Ankara: G.Ü.İletişim Fakültesi Basımevi; 2009

80. Durmaz R, Özerol İH, Kalcıoğlu T. Nazofarinks örneklerinde üç solunum yolu patojeninin mültipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle araştırılması. XXIX Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya 2000: s373

81. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranierl JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. IRL Press Limited, Oxford 1988; 16(23): 11141-11156

82. Handolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Walhfors JJ. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. J Clin Microbiol 1997; 35(11): 2854-2858

83. Peters RPH, Agtmael MAV, Danner SA, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. Lancet Infect Dis 2004; 4: 751–760

84. Andrade SS, Bispo PJ, Gales AC. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. *Shock* 2008; 30(7): 41-46
85. Davis TE, Fuller DD. Direct identification of bacterial isolates in blood cultures by using a DNA probe. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10): 2193-2196
86. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhöfer I, Müller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1353-1360
87. Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, Marco DD, et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2008; 57: 601–604
88. Wellinghausen N, Kochem AJ, Disqué C, Mühl H, Gebert S, Winter J, et al. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2009; 74(9): 2759-2765
89. Wu YD, Chen LH, Wu XJ, Shang SQ, Lou JT, Du LZ, et al. Gram Stain-Specific-Probe-Based Real-Time PCR for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2613-2619
90. Zhao Y, Park S, Kreiswirth BN, Ginocchio CC, Veyret R, Laayoun A, et al. Rapid Real-Time nucleic acid sequence-based amplification molecular beacon platform to detect fungal and bacterial bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 2007; 47(7): 2067-2078

91. Bingold T, Wissing H. Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36(1): 49-56

92. Gebert S, Siegel D, Wellinghausen N. Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MoLYsis. *J Infect* 2008; 57: 307-316

93. Chan KYY, Lam HS, Cheung HM, Chan AKC, Li K, Fok TF, et al. Rapid identification and differentiation of gram-negative and gram positive bacterial bloodstream infections by quantitative polymerase chain reaction in preterm infants. *Crit Care Med* 2009; 37(8): 2441-2446

94. Shang S, Chen G, Wu Y, Du L, Zhao Z. Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA Gene. *Int Ped Res Found, Inc* 2005; 58(1): 143-148

95. Khlif M, Mary C, Sellami H, Sellami A, Dumon H, Ayadi A, et al. Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(7): 656–661

96. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 380-385

97. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197(3): 313-324

98. Vince A, Lepej SZ, Barsic B, Dusek D, Mitrovic Z, Serventi-Seiwerth R, et al. LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J Med Microbiol* 2008; 57(10): 1306-1307

99. Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 774-779

100. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ, et al. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008; 36(5): 1487-1492

101. Dierkes C, Ehrenstein B, Siebig S, Linde HJ, Rrischl U, Salzberger B, et al. Clinical impact of a commercial available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infect Dis* 2009; 9(126): 1-7

102. Westh H, Lisby G, Breysse F, Bøddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(6): 544–551

10. EKLER

EK-1

Bilimsel çalışmanın zorlu evresinde;

Destek ve değerli bilgilerini esirgemeyen, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD başkanı sayın Prof. Dr. Semra *KUŞTİMUR*'a;

Tez konumun belirlenmesinde, tezimin çalışma aşamasında her türlü sabrı gösteren, ilgisini esirgemeyen, değerli bilgilerinden faydalandığım çok değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Ayşe *KALKANCI*'ya,

Eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Türkmeneli Kültür Merkezi Başkanı sayın Dr. Mustafa *ZİYA*'ya,

Ortak sıkıntıları paylaştığımız, bu zorlu süreçte manevi desteklerini esirgemeyen, en büyük destekcim Ayşe *SEYER*'e,

Yardıma ihtiyacım olduğu zamanlarda yardımlarını esirgemeyen anabilim dalı asistanları Araş. Gör. Dr. Burçe *YALÇIN*, Araş. Gör. Dr. Sevgi *ÖZYEĞEN ASLAN* ve Araş. Gör. Dr. Gülşah *BİTER* ile yüksek lisans arkadaşlarım Songül *TÜRK* ve Melda *MERAL*'a,

Benden desteklerini esirgemeyen, en zor anlarımda hep yanımda olan ve bana hep güvenen çok sevdiğim anneme, babama ve kardeşlerime,

En içten teşekkür ve saygılarımla.

Bio. Ali A. FOUAD

“Hayatta en hakiki mürşit ilimdir”

Mustafa Kemal Atatürk

EK-2



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

23.03/2009

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 52- 4850
KONU:

Sayın
Doç.Dr.Ayşe KALKANCI
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-09.032 kod numaralı ve "*Sepsis etkenlerinin çok hedefli PCR ile gösterilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-09.032 and entitled "*Definition of the pathogens in sepsis by multiplex PCR*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Ali A.

Soyadı: Fouad

Doğum Yeri ve Tarihi: Irak-Diyala- 18.10.1981

Eğitim:

-2008-2009 Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

-2001-2006 Bağdat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

-1997-2001 El Velid Lisesi

Yabancı Dili: İngilizce, Arapça

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Ankara Mikrobiyoloji Derneği

Bilimsel Etkinlikler: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD tarafından düzenlenen “Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Teorik ve Uygulamalı Kursu” Düzenleme Kurulu Üyesi

Katıldığı Kongreler: 25. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (28 Nisan-02 Mayıs 2010, KKTC)

6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi (15 Haziran 2010 - 19 Haziran 2010, Ankara)

Bildiriler:

1. Dizbay M, Kalkancı A, Hizel K, Caglar K, Fouad A, Arman D, Kustimur S. Multiplex PCR for the detection of fungemia and bacteremia in the same run. Trends in Medical Mycology 4. Athens, Greece, October 18-21, 2009.

2. Seyer A, Kalkancı A, Fouad A, Kuştimur S. Detection of siderophore production of *Aspergillus* and *Candida* species. Trends in Medical Mycology 4. Athens, Greece, October 18-21, 2009.

3. Fouad A, Kalkancı A, Seyer A, Dizbay M, Tunccan O, Hizel K, Çağlar K, Kustimur S. Development and the evaluation of a real- time PCR assay for molecular diagnosis of polymicrobial sepsis. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.Vienna, Austria 10-13 April, 2010. 20th ECCMID.

4. Seyer A, Fouad A, Kalkancı A, Çağlar K, Kuştimur S. Klinik *Candida albicans* kökenlerinin kullanımdaki bazı dezenfektanlara duyarlılıklarının araştırılması. 25. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, 28 Nisan-02 Mayıs 2010, KKTC.

5. Seyer A, Özyeğen S, Yalçın B, Aydın M, Jabban I, Fouad A, Biter G, Demir F, Kalkancı A, Kuştimur S. *Candida* DNA'sının klinik örneklerde gösterilmesi için geliştirilen PZR rutin uygulandığında laboratuvar için gelir getirir mi? 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi (15 Haziran 2010 - 19 Haziran 2010, Ankara)

6. Biter G, Seyer A, Jabban I, Aydın M, Özyeğen S, Fouad A, Demir F, Yalçın B, Kalkancı A, Kuştimur S. *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi tanısında gerçek zamanlı PZR kullanılması. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi (15 Haziran 2010 - 19 Haziran 2010, Ankara)

7. Aydın M, Aslan S, Jabban I, Seyer A, Fouad A, Yalçın B, Demir F, Biter G, Kalkancı A, Kuştimur S. *Aspergillus* cinsi mantarların klinik örneklerde gösterilmesine yönelik geliştirilen gerçek zamanlı PZR

reaksiyonu yönteminin kalite kontrolü. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi (15 Haziran 2010 - 19 Haziran 2010, Ankara)