

# KLİNİK MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA MOLEKÜLER TEKNİKLERİN ROLÜ

Salih TÜRKOĞLU\*

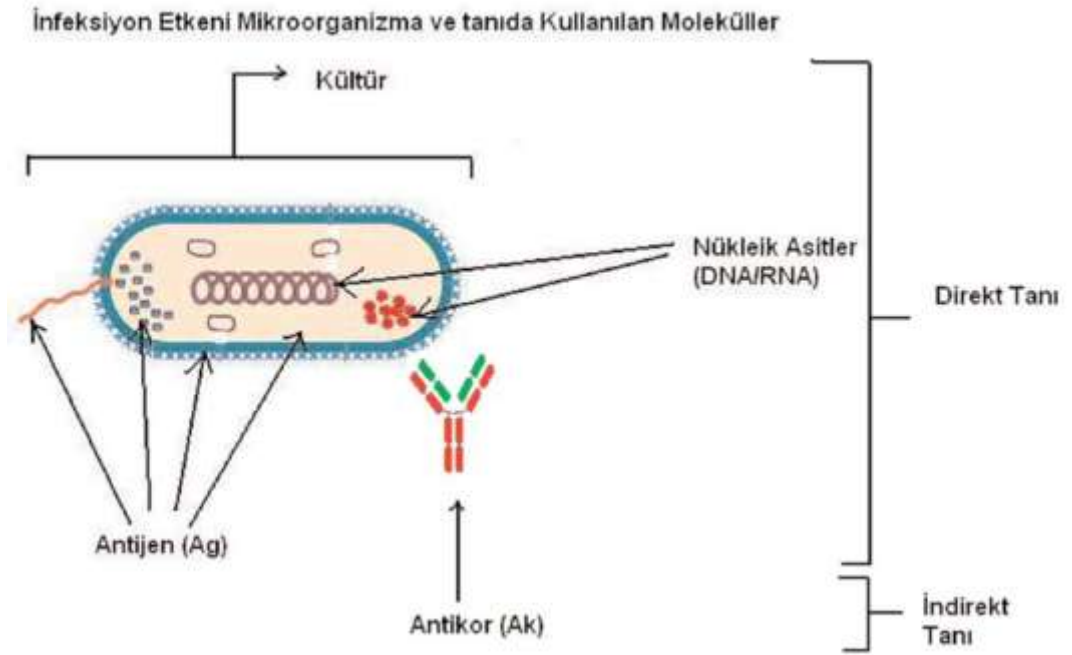
Mikrobiyoloji, özellikle tıp öğrencileri için ve bunun devamında da tıp doktorları için, tabiri mazur görün, "bela" bir konu. Bunun birçok nedenleri var, ayrıntılarına girmek başka bir yazının konusu olabilir (bu konuda çok "teorim" var doğrusu). Ama, çok basit bir örnek bunu doğruluyor. Türkçemizde (diğer yabancı diller bunu böyle kullanıyor mu bilmiyorum), bir kişiye, mikrop, dendiğinde, kötü bir şeydir, hakaret anlamına gelir. Tıp öğrencisi, mikrobiyoloji dersine, mikrop, der. Belki de, uzun bir ismi kısa söylemek ihtiyacından çıkmıştır, tıpkı, Galatasaray (ya da, hadi, Fenerbahçe) gibi isimlerin kısa versiyonlarının olması gibi; gerçi, bu isimlerin tezahüratların manzum yapısına uyum sağlaması gerekliliği, özellikle de hazır şarkıların içine monte edilme kolaylığıdır (her hece sayısına uygun isim bulunur: Fe-ner, Cim-Bom; Ka-nar-ya, Cim-Bom-Bom, vb) bunu doğuran, ama, mikrobiyolojide bu kesin yoktur, Miik-roop, miik-rop! diye bir tezahüratı kim yapar ki? Evet, tıp öğrencisi, bu derse, mikrop, diyerek, bu "bela" yı vurgular, bunu söylerken de gizli bir zevk alır, hatta, bunu, en başlarda gereğinden bile fazla dile getirir. Biz, bu bilimde çalışanlar ise, dersimize/alanımıza, ısrarla, mikrop, demeyiz, "Mikrobiyoloji" deriz.

Bu kadar uzun bir giriş yapmamın bir nedeni var kuşkusuz, mikrobiyolojiye, ne kadar, "Mikrobiyoloji" desek yeridir, mikrobiyoloji bunu hak eder. Böyle düşünmeme yol açan, bugün mikrobiyolojide kullanılan tekniklerin, ki bu yazının konusudur bu teknikler, aslında çağdaş biyoteknolojinin, gen mühendisliğinin, biyoinformatiğin hepsi ile iç içe olmalarıdır. Zaten herşey mikropların manipülasyonu ile başlamıştır ve bugün en iyi ilerlediği, işe yaradığı, gelecek vaat ettiği konulardan başta geleni mikrobiyolojidir. Burada, "işe yaradığı" kısmı çok önemlidir, çünkü kullanılır, değer yaratır ve yatırımı hak eder. Bu birçok başka anlama da gelir; istihdam yaratır örneğin. Bu yüzden, biz bir avuç "akıllı" (yo, tırnak içinde ama doğru; evet, öyle düşünüyorum) mikrobiyolog bunu fark etmişizdir ve bunun mesleki tatminini, ülkemizin olanakları içinde yaşarız, yaşamaya çalışırız. Bunu da şunun için söylüyorum, bugün gençliğin bir kısmı, ileride ne olmak istiyorsun, diye sorulduğunda, eskiden olduğu gibi, mühendis, demiyor, ama, "gen mühendisi", diyor ve bunu da belki, belli tıp dışı fakültelerde olabi-

leceğini düşünüyor, oysa artık tıp fakültelerinin temel bilimlerinin hepsinde "gen mühendisliği" var, "moleküler biyoloji" var. Tabii, tıp doktoru olmadan da tıp fakültelerinde bu alanlarda çalışılabilir, ama bu alanlarda hem tıp doktoru, hem de temel bilimci olmak da olası (bu ayrı bir tartışma konusu). Buradan yavaş yavaş, mikrobiyoloji ve moleküler yöntemlere gelmek istiyorum. Önce konvansiyonl mikrobiyoloji ne yapar, onu hatırlayarak, sonra da bu "yeni" yöntemler kendilerine nerede yer bulmuşlardır, onu vurgulayarak. Konu aslında çok uzun ve kapsamlıdır, bu yüzden olabildiğince özet kalmaya çalışacağız.

Çok iyi bildiğimiz (ya da hala öğrenemediğimiz) gibi, klinik mikrobiyolojinin birincil işlevlerinden bir tanesi mikropların muayene maddelerinde saptanmasıdır. Buna göre infeksiyon hastalıklarının tanısı konur ve tedavisi planlanır. Tanıda, mikroorganizmaların kendileri, ya da mikroorganizmalara karşı oluşmuş antikorlar saptanabilir. Mikroorganizmanın kendisine karşı oluşmuş antikorların saptanması yolu ile tanı konulmasına "indirekt" (dolaylı) tanı, mikroorganizmanın kendisinin saptanmasına da "direkt" (doğrudan) tanı denir. Direkt tanıda, kültür yapılarak mikroorganizma üretilir ya da mikroorganizmanın antijeni ya da nükleik asiti (NA) saptanır (Şekil 1). Modern mikrobiyolojik tanıda bu yöntemlerin hepsi kullanılmaktadır. Her yöntemin birbirine üstün tarafı bulunur. Klasik, kültür, yani mikroorganizmanın üretilmesi her zaman değerlidir ve belli anlamlarda hiçbir başka yöntem kültürün yerini almaz. Mikroorganizma elde edildiği andan itibaren her türlü özelliği, yani türü, ya da suş özellikleri, en önemlisi de antimikrobik ilaçlara direnci incelenebilir. Mikroorganizma canlılığını yitirmeden yıllar boyunca saklanabilir, başka mikroorganizmalarla karşılaştırılabilir, epidemiyolojisi ile ilgili bilgiler en ayrıntılı şekilde incelenebilir; nasıl ortaya çıktığı, nasıl yayıldığı, zayıf ve güçlü yönleri saptanabilir, DNA ve/veya RNA'sı moleküler yöntemler ile incelenebilir, vb. Yani kültürden değerlisi yoktur. Ama, hepimizin çok iyi bildiği gibi, hatta, hepimizin, özellikle de mikrobiyolojiden sonuç bekleyenlerimizin "muzdarip" olduğu gibi kültür, ne olursa olsun "yavaş"tır ve günümüzde yavaş olan "kaybeder"! Bir başka unsur da, bazı mikroorganizmaların kültürünün yapılamamasıdır. Sifiliz etkeni Trepo-

\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anbilim Dalı



nema pallidum gibi bakteriler, ya da birçok virus (kültürü mümkün olsa da ülkemizde mümkün değildir) için durum böyledir. Ya da kültürü çok yavaş olan, Mycobacterium tuberculosis gibi bakteriler için de kültüre alternatif olabilecek yöntemlere gereksinim bulunmaktadır. Yani bu yazının konusu olan moleküler yöntemlere.. Mikrobiyoloji tarihi alternatif yöntemlerin arayışı içinde geçmiştir. Öncelikle mikroorganizmaların antikorları ve antijenleri çeşitli vücut sıvıları ve kanda aranmıştır ve infeksiyon hastalıklarının tanısında çok önemli bir ilerlemeyi ifade ederler. Özellikle "monoklonal" dediğimiz ve çok özgül olan, yani yalnızca belli bir mikrobu tanıyan (ve başka birşeyle reaksiyon vermeyen) antikorlar tanıda devrim yaratmışlardır. Bunları bulan araştırmacılar Nobel ödülü almışlardır (tıpki, DNA dizilerini okuma tekniğini bulan, ve son olarak da PCR, polymerase chain reaction-polimerize zincir tepkimesi, yöntemini bulan araştırmacılar gibi; buna aşağıda değineceğim). Özgül antijen ve antikorları saptayarak infeksiyon hastalıkları tanısına gitmenin de belli avantajları bulunmaktadır ki, yeri doldurulamaz. Örneğin maliyet bu yöntemlerde oldukça düşük olabilmektedir çünkü, çok sayıda örnek aynı anda işlenebilir (tabii, laboratuvarın örnek kapasitesi ne kadar yüksek ise maliyet o kadar düşmektedir; burada belli işlemlerin merkezileşmesi gerekliliğine gönderme yapmakta yarar var; herkes herşeyi yapmamalıdır, örneğin özel sektör, 'rasyonel' çalışma mantığı ile bunu yapmaya başlamıştır, devlet sektöründe de buna gereksinim vardır-burada bölünmüşlüğü "maksimum" olduğu üniversite hastanelerine bir gönderme yapıyorum). Ancak, mikroorganizmanın zamanında ve 'doğru' bir şekilde saptanmasında bu yöntemlerin sıkıntısı bulunmaktadır. Monoklonal antikorlar ne kadar özgül de olsalar bazı mikroorganizmaların tanısında çapraz reaksiyon kaçınılmazdır; yani, aranan mikroorganizmada bulunan antijenlere çok

benzeyen antijenler ile reaksiyon oluşabilir, yanlış "mikrop" (bilgisayar ortamında, daha çok, internet yazışma ortamında kullanılan gülünç surat-"smiley" lerin birgün ciddi bir hedefe gülyüzle varmaya çalışan yazarların bilimsel yazılarına gireceğinden hiç kuşku yok, ancak bu kez bundan imtina ediyorum, ancak bunu kullanma cesaretim olsa idi, 3 satır harcamamış olacaktım) saptanmış olur ve bu da domino taşı gibi, bir dizi hatalı ve istenmeyen süreç doğurur. Moleküler yöntemler iyice yaygınlaşıp kullanıma girdikçe rafa kalkacak ilk yöntem grubu, benim görüşüme göre, antijen saptama yöntemleri olacaktır. Antikorlar, organizmanın mikroorganizmalara yanıtı olarak oluştuğu için bunları saptamanın yerine geçecek bir yöntem bugün için ufukta görünmemektedir. Bugün çok kullanılan, aşılamaya bağışıklık durumumuzu ortaya koyduğumuz özgül antikor saptadığımız durumların (örneğin, B hepatitine karşı bağışık olup olmadığımızı gösterdiğimiz, aşılamanın tutup tutmadığını anladığımız anti-HBs testi) yerine geçecek test yoktur. Ya da, bir toplum ya da toplulukta bir hastalığın sıklığını saptamada gerçekleştirdiğimiz özgül IgG saptama testleri değerlerini uzun süre koruyacaklardır. Konvansiyonel mikrobiyoloji yöntemlerine bir bakıştan sonra, şimdi biraz moleküler yöntemlerin (DNA/RNA yöntemleri) özelliklerine bakmakta yarar var; bu yöntemler çok önemli bir potansiyel getirdiler ve gelecekte çok daha yaygın kullanılacaklar, şimdiden belli mikroorganizmaların tanısında alternatifleri yok. Bunu sağlayan nedir, sorusunu alt başlıklarda açıklayalım:

**DNA/RNA'nın kolay elde edilmesi.** DNA/RNA moleküllerinden özellikle DNA, çift sarmal yapısı ile çok "stabil", dayanıklı bir moleküldür ve tıbbın birçok başka alanında olduğu gibi, mikrobiyolojide de kullanılır. Bu çok önemli özelliği sayesinde istenirse saf olarak elde edilebilir, ya da sade-

ce protein ve lipid yapılardan "ayrılması" sağlanır; bazı eriticiler ve deterjanlar sayesinde, DNA/RNA, ortamda "çıplak" kalır ve üzerinde araştırmalar yapılmaya uygun hale gelir. İçinde herhangi bir mikrop ya da mikroplar aranacak bir muayene maddesinde bu moleküllerin "üniversal" özelliklerinden dolayı yapılacak işlemler çok benzerlik gösterir. Mikrop, bir virus, bir bakteri, bir mantar, ya da insan genomuna "entegre" olmuş bir mikroorganizma DNA'sı (örneğin HIV) bile olsa, işlem değişmez. Örneğin, akut bir solunum yolu enfeksiyonunda muayene maddesinde bir virus, bir bakteri ya da bir mantar aynı anda aranabilir.

**Primer/Prob-Oligonükleotid sentezi:** Bir muayene maddesinde mikroorganizmanın moleküler yöntemler ile aranabilmesi için o mikroorganizmaya özgü (ama ancak o mikroorganizmaya özgü!) moleküllerin hedeflenmesi gerekir. Anti-jen saptama yöntemlerinde bu, o mikroorganizmada olan, ancak başka mikroorganizmalarda olmayan, özel (spesifik) protein molekülleridir (bu da çeşitli testlerle kanıtlandıktan sonra belirlenir). Nükleik asitlerin muayene maddesinde aranması için ise, genel kavram olarak, o, özgül proteinlerin "kodlandığı" DNA (RNA) dizileri hedeflenir. Bu aşamada hedeflenen mikroorganizmaya özgü DNA/RNA dizilerini içeren kısa DNA (RNA da olabilir) moleküllerine gereksinim vardır. Bu moleküllere "prob" adı verilir. Kısaca, muayene maddesinden elde edilen DNA/RNA ısıtılarak (ya da güçlü baz etkisi ile) tek zincir haline getirilir ve in-vitro koşullarda prob ile "hibridize" olması sağlanır. Bu reaksiyonun gerçekleştiğini görünür hale getirmek için de çeşitli işaretleme ve görüntüleme yöntemleri kullanılır. Bu amaçla, substrat denilen maddelere çeşitli enzimlerin etkisi ile, çeşitli renklerin oluşumu (kolorimetrik) ya da ışımaya (luminesans) meydana gelir, ya da floresan boyalar ve ultraviyole ışığının (UV) etkisi ile, reaksiyon ortamında hedef molekülün varlığı görünür hale getirilir.

**Bu, hibridizasyon reaksiyonudur:** PCR ve diğer nükleik asit çoğaltma teknikleri de aslında temel olarak bu 'hibridizasyon' reaksiyonunu kullanırlar. Bu tekniklerdeki "çoğaltma" başlamadan önce mutlaka, bu kez "primer" (başlatıcı) dediğimiz kısa nükleotid parçaları (oligonükleotidler) hedef (mikroorganizma) nükleik asitle "hibridize" olurlar, reaksiyon bunun üzerinden sürer. Bu aşamada iki şey önemle vurgulanmalıdır: Bir tanesi, teknolojik olarak DNA dizilerini in-vitro sentezleyebilmemizdir. Bugün, istenilen nükleotid sırası ile DNA'yı sentezletebilmekteyiz (oligonükleotid sentez teknolojisi). Bunu isteyen herkes, ilgili ticari firmalara çok yüksek olmayan bir ücret karşılığında yaptırabilmektedir. İkinci nokta, DNA dizilerini okuyabilmemizdir. İnsan genomunun dizisinin bile belirlendiği bir dönemdeyiz, ancak, yine de mikroorganizma tanısında belirli mikropları hedefliyorsak, o mikroplar ile ilgili DNA/RNA dizilerini biliyor olmamız gerektiğini akılda tutmalıyız.

**Özgüllük/Spesifite:** Bu aşamada vurgulanması çok önemli bir nokta bulunmaktadır. Sentezlenen DNA dizileri, uygun reaksiyon koşulları kullanıldığı sürece son derece özgüldürler. Yani, in-vitro olarak, ortamda tek bir baz farkı olduğunda bile daha uygun DNA parçası ile "rehibride" olurlar (ya da o olmadığında olmazlar). Hem de bu reaksiyon ortamda milyonlarca başka DNA parçası olduğunda bile özgül olarak, rahatça gerçekleşir. Örneğin, insan genomuna integre olmuş, bir HIV proviral DNA'sı, uygun seçilmiş, yalnızca bir çift 'primer' ile, son derece başarılı bir PCR ile saptanabilmektedir, hem de ortamda her biri  $3 \times 10^9$  baz içeren binlerce insan genomu olduğu halde... "Mikroorganizmanın o cins ve türünü çok iyi temsil ettiği belirlenen bölgesinden seçilen bir primer/prob ile son derece özgül bir reaksiyon olması sağlanır".

**PCR ve Nükleik asit çoğaltma teknikleri:** PCR, sırf mikroorganizma tanısında değil, tüm biyolojik bilimlerde devrim yaratmıştır. Buna çok iyi bir örnek insan genom projesi kapsamındaki, insan genomunun tüm dizilerinin okunması, PCR sayesinde öngörülenden çok daha kısa bir sürede sonlandırılabilmiştir. Mikrobiyolojide ise, özellikle virolojide PCR'ın katkısı çok büyük olmuştur. Her geçen gün yeni bir örneğini gördüğümüz, yeni keşfedilen mikroorganizmaların ortaya çıkarılması için elektron mikroskopi ve kültür gibi yöntemlerin kullanılmasına gerek kalmamıştır. Ya da, çeşitli kültür teknikleri ile üretilmeyen, belki de hiç üremeyecek (üreme özelliği olmayan), mikroorganizmaların saptanması için çeşitli moleküler yöntemlerin bir arada kullanılması ile son derece başarılı ilerlemeler sağlanmaya başlanmıştır. Bunun ilk örneği hepatit C virusu olmuştur. Viral hepatiti olan hastaların, var olanlar dışında (ne-A, ne-B hepatiti) bir etken ile infekte olmuş olmaları gerektiği üzerine derinleştirilen araştırmalar yeni bir virusun, kültürü yapılmadan ve görüntülenmeden ortaya çıkarılmasını dünyada ilk kez sağlamıştır. Virusun konvansiyonel kültürü bugün hala yapılamamakla birlikte, elektron mikroskobu ile görüntülenmesi de ancak sonraki yıllarda gerçekleştirilebilmiştir. Bu, özel bir firmanın bünyesinde gerçekleştirilmiş ve belki de dünyada ilk kez bir "mikrop" un patenti alınmıştır. Bu mikroorganizma ile ilgili geliştirilen herşey bu firmanın izni ile gerçekleştirile-gelmiştir. Bunu, başka mikroorganizmalar izlemiştir (Tablo 1). Bu gelişmeler mikrobiyolojinin temellerini de değiştirmiştir. Bir mikroorganizma ile bir hastalık ilişkisini, mikropların hastalık yaptığını (enfeksiyon hastalıklarını) dünya tarihinde ilk kanıtlayan, mikrobiyolojinin "babalarından" Robert Koch'un, bu amaçla geliştirdiği "Koch Postulatları" da moleküler çağa kendini uydurmak zorunda kalmıştır. Artık, "moleküler Koch postulatları" vardır.

**PCR:** PCR, bir hücredeki DNA replikasyonu mekanizmasını kullanarak özgül bir dizinin milyonlarca kez çoğaltılmasını sağlayan, 1983 yılında A.B.D.'li Kary Mullis'in bulunduğu ve bu buluşla 1993 yılında kimya Nobel'i aldığı bir tek-

Tablo 1. Son 20 yılda bulunan başlıca viruslar ve hastalıkları

Yıl	Mikroorganizma	Grup	Hastalık
1989	Hepatit C	Virus	Parenteral bulaşan non-A, non-B hepatiti
1991	Guanarito virus	Virus	Venezuela kanamalı ateşi
1993	Sin Nombre virus	Virus	"Hantavirus pulmonary syndrome" (HPS)
1990	Sabia virus	Virus	Brezilya kanamalı ateşi
1994	Hendra virus	Virus	Atlardan insana bulaşan ensefalit
1995	İnsan herpesvirus 8 (HHV-8)	Virus	Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirus
1995	Hepatit G virusu (GB virus C)	Virus	Hepatit?
1996	Creutzfeldt-Jakob hastalığı etkeni varyantı	Prion	Progresi dejeneratif nörolojik hastalık
1997	H5N1 "avian influenza"	Virus	Kuşlardan insanlara bulaşan influenza
1999	Nipah virus	Virus	Domuzlardan insana bulaşan ensefalit
2001	İnsan metapnörovirusu	Virus	Akut solunum infeksiyonu
2003	SARS -Co	Virus	Akut solunum infeksiyonu
2004	İnsan Koronavirüsü NL63 (HCoV-NL63)	Virus	Solunum yolu infeksiyonu?
2005	İnsan Koronavirüsü HCoV-HKU1	Virus	Solunum yolu infeksiyonu?
2005	İnsan bocavirüsü (HBoV)	Virus	Solunum yolu infeksiyonu?

Bu liste yeni bulunan tüm mikroorganizmaları kapsamamaktadır. Yeni bulunan mikroorganizmaların tümü henüz insanda bir hastalıkla kesin ilişkilendirilmemiştir.

niktir. Bunu gerçekleştirmek için laboratuvarın özel bir altyapısı olması gereklidir, ve tabii ki bilgi birikimi. Ama, bunlar olduktan sonra, o laboratuvar dünyada istediği her genom ile çalışma yürütebilir. Yani, diğer başka hiçbir altyapı gerekmeden tüm mikroorganizmaları PCR ile çoğaltabilmek mümkündür. Yukarıda söz edildiği gibi, dizilerini bilmek, sentezletirmek (yalnızca 2 adet primer yeterlidir teorik olarak) ve çoğaltmak; çünkü PCR için gerekenler:

- Çoğaltılacak (hedef) DNA parçası
- Hedef dizinin her iki ucuna eş dizide sentetik iki adet "primer"
- Dört nükleotidden bol miktarda bulunması (dNTP: dATP,dTTP, dCTP, dGTP)
- Taq (Thermus aquaticus bakterisi) DNA Polimeraz (ısıya dirençli bir DNA polimeraz enzimi)'dir.

Bu aşamada bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. PCR, tek bir DNA parçasını bile çoğaltabilir. Bu potansiyel, aynı zamanda PCR'ın en büyük zaafıdır. Elde ettiğiniz sonuçların güvenilirliğini de o ölçüde bozar. Özellikle moleküler tanı laboratuvarlarında bu sorunu çözmeye çok gereksinim olmuş ve son yıllarda bu alanda çok büyük teknolojik ilerlemeler kaydedilmiştir. Moleküler tanı ülkemizde henüz başlangıç aşamasındadır. Batı'da ise çok daha hızlı bir ivme ile ilerlemektedir. Birçok mikroorganizma tanısında artık moleküler yöntemler esas standart olmuştur ve moleküler tanı laboratuvarlarının örnek potansiyelleri yıllık yüzbinler ile ifade edilmeye başlanmıştır. Örneğin, kan bankalarında, HIV/AIDS-hepatit B virusu ve hepatit C virusu taranması dünyanın hemen tamamında (ve ülkemizde de) serolojik yöntemler ile yapılmakta iken, A.B.D, Fransa, Almanya ve Japonya gibi endüstri devlerinde donör kanlarında bu mikroorganizmaların nükleik asitleri moleküler yöntemlerle taranmaya başlanmıştır. Bunun getirisini şu rakamlar açıklamaktadır: hepatit C virusu infeksiyonunda

(A.B.D.), moleküler yöntemlerden önce 276 000 donasyonda 1 olarak hesaplanan HCV bulaşı, moleküler yöntemlerin devreye girmesi ile 2 000 000 donasyonda 1 olarak hesaplanmaktadır. Moleküler tanının ne denli önemli kullanım alanları bulması ile ilgili iyi örnek olabilecek alanlardan birisi viral hepatitlerdir. Okuyucunun, bu sayıdaki "viral hepatitlerin tanısı" bölümüne bakması bunu kavramak için yeterlidir. Bu yüzden bu yazının sınırları içerisine koymadım. Ancak, başlıca PCR'ın patent sorunu (uzun yıllar boyunca tek bir firmada kalması) ya da, var olan zaafalarının olmayabileceği başka yöntemlerin kullanılıp kullanılmayacağı sorusu, araştırmacıları başka yöntemlerin arayışına da itmiştir. Bugün, PCR kadar başarılı birçok yöntem geliştirilmiş ve uygulamaya girmiş, ticari olarak da elde edilebilmektedir. Bunların bir kısmı,

- TMA: transcription-mediated amplification (transkripsiyon yolu ile çoğaltma)
  - NASBA: nucleic acid sequence-based amplification (nükleik asit dizisi temelli çoğaltma)
  - LCR : ligase chain reaction (ligaz zincir reaksiyonu; kullanım alanı azalmıştır)
  - bDNA: branched DNA (dallanmış proplar)
  - Qbeta replikaz
  - SDA: Strand Displacement Amplification (iplik yer değiştirmesi yolu ile çoğaltma)
  - Hybrid Capture (hibrid yakalama), olarak sayılabilir.
- Bugün, A.B.D.'nin önemli bir kurumu olan Food and Drug Administration (FDA)'ın onayı bulunan NA testleri ve hedeflediği mikroorganizmalar ile ilgili tablo bize bir fikir vermektedir (Tablo 2).

Gerçek-zamanlı PCR (Real-Time PCR) ve yöntemler. Günümüzde PCR ve benzeri NA çoğaltma yöntemleri, testin gerçekleştiği tüp içerisine eklenen çok özellikli fluoresan

Tablo 2. Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Rutin Tanıda Kullanılan ve Ticari Olarak Elde Edilebilen Moleküler Yöntemlerden En Önemlileri ve Kullanım Alanları\*

Mikroorganizma	Kullanılan Yöntem
C. trachomatis saptanması	HC** TMA PCR
N. gonorrhoeae saptanması	HC TMA PCR
C.trachomatis and N.gonorrhoeae saptanması	SDA HC TMA PCR
Gardnerelle spp., Trichomonas vaginalis, and Candida spp.saptanması	Hibridizasyon
Group A Streptokok saptanması	TMA
Group B Streptokok saptanması	Real-Time PCR
Legionella pneumophila saptanması	SDA
« Methicillin-resistant S.aureus » saptanması	Real-Time PCR
M.tuberculosis saptanması	TMA PCR
Mycobacterium spp., çeşitli mantarlar ve bakteriler için kültür confirmasyonu	Hibridizasyon
Sitomegalovirus (CMV) saptanması	PCR HC NASBA
Hepatit C virusu (HCV) saptanması	TMA RT-PCR
HCV miktar tayini (virus yükü saptanması)	bdNA
“Human Immunodeficiency Virus-1” (HIV-1) ilaç direnci saptanması	DNA dizi analizi
HIV-1 miktar tayini (virus yükü saptanması)	bdNA NASBA RT-PCR
Kan donörlerinin Hepatit B virusu (HBV), HCV ve HIV-1 açısından taranması	TMA RT-PCR PCR
Human Papillomavirus (HPV) saptanması	HC

\* Manuel of Clinical Microbiology, 2007, American Society for Microbiology'den alınmıştır

\*\* Hybrid Capture (hibrid yakalama); bir çeşit hibridizasyon reaksiyonu

boyalar ve bunların otomatik cihazlar tarafından “anında” saptanması sayesinde, tüpler hiç açılmadan ve reaksiyon parametrelerinin bilgisayar ekranında grafik olarak görünür hale getirilmesi ile çok büyük bir ilerleme kaydetmişlerdir. Bu sayede PCR’in bazı dezavantajları ortadan kalkmıştır. Yakın gelecekte bu yöntemler hemen her laboratuvarında kullanıma girmeye aday görünmektedirler.

**Otomasyon:** Son yıllarda NA’leri hedef alan tekniklerin geldiği son nokta otomasyondur. Yukarıda değinildiği gibi, gerçek zamanlı yöntemler PCR aşamasının otomatik olmasını sağlamıştır. Son olarak NA eldesi de otomatik cihazlar ile yapılmaya başlanmıştır. Çok yakın bir gelecekte, çok kısa bir sürede sonuç alacağımız, tamamı otomatize ve başlangıçta cihaza yalnızca bir muayene maddesi, örneğin serum (ya da tam kan), koyacağımız bir “çağın” gelmekte olduğunu görüyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Scott JD, Gretch D R. Molecular Diagnostics of Hepatitis C Virus Infection A Systematic Review. JAMA 2007—Vol 297, No. 7 724-732
2. Nolte FS, Caliendo AM. Molecular detection and identification of Microorganisms. Manuel of Clinical Microbiology, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (editörler), 2007, American Society for Microbiology
3. Thorner AR, Dolin R. Zoonotic Paramyxoviruses: Hendra, Nipah, and Menangle Viruses In: Mandell, Bennett, & Dolin: Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. 2005 (elektronik baskı).
4. Brown D, Lloyd G. Zoonotic Viruses In: Cohen & Powderly: Infectious Diseases, 2nd ed., 2004, (elektronik baskı).