

## *Enfeksiyon Hastalıklarının Tanı ve Tedavisi*

### *Yeni milenyum için moleküler yöntemler*

Michael A. PFALLER<sup>1</sup>

Moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılan teknikler, enfeksiyon hastalıklarının epidemiyoloji ve patogenezi anlamamıza büyük katkıda bulunmuşlardır. Son on yıl içerisinde bu teknikler, klinik materyallerdeki mikroorganizmaların tanınmasında ve tiplerinin belirlenmesinde (identifikasyonunda) yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Pek çok klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, nükleik asit amplifikasyon yöntemlerini enfeksiyonların tanısında, patojenlerin belirlenmesinde ve antimikrobiyal direnç genlerinin karakterizasyonunda kullanmaktadır. Belki de, moleküler yöntemlerin en heyecanlı uygulama alanı, klasik kültürler ve mikroskopik yöntemlerle tanı almayan enfeksiyonların etkenlerinin belirlenmesidir. Dahası, mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle karakterizasyonu, hem epidemiyolojik araştırmalar, hem de hastanelerde enfeksiyon kontrolü açısından güçlü bir gereçtir.

Klinik laboratuvarlarda, mikroorganizmaların tanısında kullanılan çeşitli nükleik asit kökenli kitler mevcuttur. Bazı sistemlerde, nükleik asit problemleri klinik materyallerden mikroorganizmaların direkt belirlenmesi ya da daha önce izole edilen mikroorganizmaların tiplendirilmesi için kullanılırken, diğer sistemlerde ise proba hedef sekansı-dizilimi belirlemeden önce, bir tür sinyal veya hedef amplifikasyon tekniği kullanılmaktadır.

#### **Nükleik Asit Probuna Dayanan Sistemler**

Nükleik asit problemleri, patojenleri direkt olarak klinik materyallerde belirleyebilir, aynı zamanda

kültürle izolasyonu izleyerek mikroorganizmaları ayırıştırabilir. Çok farklı yöntem seçenekleri bulunsa da, ticari ürünler geliştirilirken, hemen hemen sadece solusyon-faz hibridizasyon ve non-izotopik olarak işaretlenmiş problemler kullanılmaktadır. Bu tür dizilime (sekansa) spesifik problemler klinik örneklerdeki patojenlerin hızlı ve basit olarak tanınmasını sağlarlar da, sensitiviteyi düşüktür. Çoğu direkt prob assayinde tanı için hedef nükleik asidin mikrolitresinde 10.000 gen kopyasının bulunmasına gereksinim duyulurken, direkt prob assaylerinin sinyal veya hedef amplifikasyonu ile beraber kullanılması durumunda bu sayı mikrolitrede 500 gen kopyasına kadar inebilmektedir. Prob assayleri hem HIV hem de HCV'de viral yükün kantitatif olarak belirlenmesinde yaygın olarak kullanılırlar da, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind.) gibi hedef amplifikasyonuna dayanan yöntemlerin analitik sensitivitesine hiçbir zaman ulaşamamaktadırlar.

Solusyon-faz hibridizasyon ve non-izotopik işaretleme kullanan bazı sistemler: GeneProbe (San Diego, Calif.) PACE 2 sistemi ve Digene (Gaithersburg, Md.) ve Murex (Abbott Park, Ill.) hibrid capture assay (HCA) sistemleridir. Bu sistemlerin avantajları, uzun raf ömürleri, kullanıcı için kolay olan formatları, ve küçük veya büyük sayılardaki örnekleri çalışabilmedeki esneklikleridir.

Amplifiye edilmiş ürünleri tanımak için problemler kullanan moleküler-kökenli yöntemlere bir örnek dallanmış zincirli (branched chain) DNA tayinidir

<sup>1</sup> University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Iowa.



(Bayer Corporation, Tarrytown, N.Y.). Bu yöntem, enzim immünassaylere benzer bir format kullanır ve viral partiküllerin hem tanınmasını hem de kantifikasyonunu sağlar. Sinyal amplifikasyonuna dayanan yöntemler, hedef amplifikasyon yöntemleri kadar sensitif olmasalar da, kantitatif sonuçlar viral yükü ve prognozu belirlemede, ayrıca tedaviye olan cevabın izlenmesinde yardımcı olabilirler.

Prob hibridizasyonu ile kültür identifikasyonu, mikobakteriler gibi yavaş üreyen mikroorganizmalar veya ticari identifikasyon sistemleri bulunmayan mikroorganizmaların tanısı için yararlıdır. Kültür identifikasyonunda kullanılan ticari problemlerin hemen hepsi Gen-Probe tarafından üretilmektedir. Acridinium ile işaretli türe spesifik rRNA problemleri bulduran bu sistemler, bir iş günü içerisinde kültürden identifikasyonu sağlamaktadırlar. Dahası, mükemmel sensitivite ve spesifisiteleri sayesinde, Gen-Probe sistemleri M.tuberculosis ve ilişkili türlerin tanısında başlıca dayanaklardan biri olarak kabul edilmektedirler.

#### Nükleik asit amplifikasyon sistemleri

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında nükleik asit amplifikasyonu kullanmanın en büyük avantajı, yöntemin düşük konsantrasyonlarda mevcut olan spesifik hedefleri amplifiye edebilme yeteneğidir. Geliştirilen amplifikasyon tekniklerinin ilki olan PCR, hem araştırma laboratuvarlarında hem de klinik laboratuvarlarda hala en yaygın olarak kullanılan moleküler tanı yöntemidir. Diğer amplifikasyon stratejileri arasında ligaz zincir reaksiyonu (Abbott laboratuvarları, Abbott park, Ill.), nükleik asit sarmalına dayanan amplifikasyonlar (Organon Technica, Durham, N.C.), sarmal yer değiştirme amplifikasyonları (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J.) ve transkripsiyon aracılı amplifikasyonlar (Gen-Probe) bulunmaktadır. Farklı patojenler için çok sayıda karşılaştırmalı çalışmalar yayınlanmış olsa da, değişik amplifikasyon stratejileri kullanarak ulaşılan tanı düzeyleri açısından yöntemler arasında ne derece belirgin farklılık olduğu hala çok net değildir. Bu aşamada, mevcut olan yöntemlerden hiçbirinin PCR sensitivitesine ulaşamadığı söylenebilir.

Şimdiye kadar, enfeksiyon hastalıkları için, amplifikasyon kökenli ürün seçenekleri oldukça sınırlıydı. Genel olarak piyasadaki sistemler, spesifik viral hastalıkların (HCV, HBV, HIV ve CMV) tanısına ve cinsel yolla geçiş gösteren hastalıkların başlıcalarına (N.gonorrhoeae ve C.trachomatis) ve M. tuberculosis'e yöneliktir. Virtüslerin kantitatif ta-

yinine ek olarak, klinik materyallerde viral yükün kantitatif olarak belirlenmesi HCV, HIV, HBV ve CMV enfeksiyonlarında tanı, prognozda ve tedaviye cevabın izlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Ticari amplifikasyon sistemlerinin geliştirilmesi ile, enfeksiyon hastalıklarında moleküler tanı daha fazla kabul görmeye başlamıştır. Bu sistemler sayesinde laboratuvarlar, örnek kontaminasyonunu engelleyebilmekte, reaktif standardizasyonu ve reaksiyon otomatizasyonunu sağlayabilmektedirler. Bir mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılması planlanan moleküler tanı sistemi seçilirken, sunabildiği testlerin sayısı, laboratuvarın iş akışına olan uygunluğu ve maliyeti göz önüne alınmalıdır. Çoğu laboratuvar için en uygun yaklaşım, mümkün olan en fazla test sayısına sahip olan sistemi seçmektir.

#### Patojenlerin belirlenmesi

Amplifikasyona dayanan yöntemler sıklıkla klinik materyallerden patojenlerin direkt tayini için kullanılsalar da, hem kültürü yapılmış hem de kültürü güç olan mikroorganizmaları belirleyebilmek açısından da değerlidirler. Türe spesifik bir amplifikasyon reaksiyonu, M. Tuberculosis gibi asit-fast bir etkeni hızla belirleyebilir. Ya da amplifikasyon bir genus içindeki universal bir dizilimi hedef alabilir, bundan sonra elde edilen amplikon restriksiyon endonükleazlar ile sindirim, farklı problemlere hibridizasyon ve türler arasında ayırım yapabilmek için dizi incelemesi gibi ileri yöntemlerle karakterize edilir. Amplifikasyonla kültürlerden yapılan tayinler başlangıçta sadece yavaş üreyen mikobakteriler için kullanılmıştır, fakat zaman içerisinde klasik yöntemlerle belirlenmesi güç ya da imkansız olan patojenlerde de uygulama alanı bulmuştur.

#### Moleküler Yöntemlerle Antimikrobiyal Direnç Belirlenmesi

Antibiyotik direnci global bir problem haline geldiği için, klinik ortamlarda direncin daha hızlı belirlenebilmesi için moleküler yöntemler giderek daha yaygın olarak kullanılacaklardır. Moleküler teknikler kullanılarak yürütülen araştırmalar, antimikrobiyal direnç genetiğini ve direnç determinantlarının yayımını anlamamıza çok büyük katkıda bulunmuşlardır. Antibiyotik direnç taramasında kullanılan klasik yöntemler, potansiyel olarak etkin terapötik ajanları seçmemize yardımcı olsalar da, hem yavaş hem de bir organizma topluluğunda düşük düzeylerde varolan direnç me-

kanizmalarını güvenilir olarak belirlemede yetersiz oldukları için çok problemlidirler.

Farklı ajanlara verilen cevabı denetleyen konvansiyonel antibiyotik duyarlılık testleri, sadece mikroorganizmanın fenotipik profilini belirleyebilmektedirler. Fakat, örneğin stafilokoklardaki metisillin direnci çok heterojen bir şekilde ifade edilebilir, böylelikle de bu organizmadaki direncin doğru fenotipik karakterizasyonu güç olabilir. Sonuç olarak, günümüzde çoğu mikrobiyoloji laboratuvarı, metisillin direncinin belirlenmesinde direnç geni mec A'nın moleküler analizini altın standart olarak kabul etmektedir.

Ek olarak, moleküler yöntemler direnç genotiplendirilmesi amacıyla değişik türdeki mikroorganizmaların spesifik antimikrobiyal direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, çok sayıda viral enfeksiyonda ilaç direnci etkin tedaviye büyük bir engel oluşturduğu için, antiviral ajanlara dirençle ilişkili spesifik mutasyonların belirlenmesi giderek önem kazanmaktadır.

#### **Moleküler epidemiyoloji**

Epidemiyologlar mikrobiyal patojenlerin laboratuvarında karakterizasyonuna sıklıkla başvursalar da, antibiyogram, serotiplendirme, biyotiplendirme ve faj tiplendirmesi gibi standart fenotipik yöntemler, enfeksiyon hastalıkları epidemiyolojisinde çok sınırlı kullanım alanı bulmaktadır. Bu yöntemler yavaş oldukları ve çok fazla iş gücü gerektirdikleri için çok tercih edilmemektedirler. DNA kökenli teknikler bu problemlerin çoğunu ortadan kaldırmış ve epidemiyolojik tiplendirmede tercih edilen yöntemler haline gelmişlerdir. En sıklıkla kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri; plazmid profillendirmesi, plazmid ve genomik DNA'nın restriksiyon endonükleazları ile analizi, spesifik DNA problemleri kullanılarak yapılan Southern hibridizasyon analizi, pulse alan jel elektroforezi veya PCR'a dayanan yöntemler kullanarak yapılan kromozomal DNA profili belirlenmesidir. Bu yöntemlerin hepsinde, DNA fragmanları, kromozomlar ve plazmidler elektrik alanı kullanılarak parmak izleri olarak adlandırılan ve etidium bromid ile boyama veya nükleik asit prob hibridizasyonu ile görüntülenebilen birbirlerinden farklı parçacıklara ayrıştırılmaktadırlar.

Moleküler tiplendirme genellikle farklı izolatların bir veya daha fazla test için farklı mı yoksa benzer mi sonuç vereceğini belirlemede kullanılır. Epidemiyolojik olarak ilişkili olan izolatlar aynı DNA

profiline veya parmak izine sahipken, sporadik veya epidemiyolojik olarak bağlantısız izolatlar ise çok farklı izolatlara sahiptirler. Eğer farklı hastalardan elde edilen izolatlar aynı parmak izini paylaşıyorlarsa, ya aynı klondan kaynaklanıyorlardır ya da ortak bir kaynak veya ortak bir mekanizma aracılığı ile hastadan hastaya geçmişlerdir. Bir hastadan tekrarlar şeklinde bir organizmanın aynı suşu elde ediliyorsa, bu organizma büyük olasılıkla o bireyi kolonize veya enfekte etmektedir ve klinik açıdan anlamlıdır.

Araştırmacılar son zamanlarda DNA kökenli tiplendirme yöntemlerini kullanarak hastalarda kolonize edici izolatlarla enfekte edici izolatlar arası ilişkiyi araştırmışlar ve kontamine edici suşları enfekte edici suşlardan ayırmaya, hastanede yatan hastalar arasındaki nosokomiyal geçişi belirlemeye, enfeksiyon tedavisi gören hastalarda reenfeksiyon ve rölapsı birbirinden ayırmaya ve zaman içerisinde antimikrobiyal direnç gösteren suşların hastane içinde nasıl yayıldığını belirlemeye çalışmışlardır. Bazı yöntemler belirli mikroorganizmalar için diğerlerinden daha kullanışlı veya daha kolay uygulanabilir olsalar da, epidemiyolojik inceleme açısından bakıldığında, elimizde olan DNA-kökenli tiplendirme yöntemlerinin çoğunun özellikle nosokomiyal enfeksiyonların araştırılması için çok avantajlı oldukları görülecektir. Tersine, en güçlü ve en geliştirilmiş tiplendirme yöntemleri bile, anlamlı epidemiyolojik veriler olmaksızın tek başlarına kullanıldıklarında, çelişkili ve kafa karıştırıcı sonuçlar verebilmektedir.

#### **Geleceğe bir bakış**

Moleküler biyolojik yöntemler hiç şüphesiz enfeksiyon hastalıklarını anlamamızı kolaylaştırmıştır. Özellikle, hem nükleik asit problemleri, hem de amplifikasyona dayanan yöntemlerden yapılan adaptasyonlar, çoğu mikrobiyal patojeni belirleme, ayırtma ve karakterize etme yeteneğimizi arttırmıştır. Yapılacak basitleştirmeler ve standardizasyonlar sayesinde, bu yöntemler klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında moleküler tanıyı her gün kullanılır hale gelecektir.

Moleküler yöntemler güçlü olsalar bile, onların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki konvansiyonel yöntemlerin yerini alacağını düşünmek yersizdir. İleri incelemelerde kullanılmak üzere mikroorganizmaların kültür ortamından izolasyonu her zaman gerekli olacaktır. Organizmaların moleküler ve fenotipik karakterizasyonu, taksonomik amaçlar



ve direnç mekanizmaları, yeni ilaç geliştirilmesi ve patogeneze çalışmalarını için gerekli olacaktır. Her yeni teknolojik gelişme sürecinde olduğu gibi, klinik laboratuvarlar kullanışlı buldukları yöntemleri benimseyecekler, kullanışsız ve modası geçmiş olduğunu düşündükleri testleri ise bırakacaklardır.

En azından yakın gelecek için, direnç genotiplendirmesinin, antimikrobiyal direnç tanısında kullanılan fenotipik yöntemlerin tamamen yerini almasını beklemiyoruz. Moleküler yöntemler son derece spesifik olsalar bile, yeni gelişmekte olan direnç genlerini belirleyemezler, genin daha önce gözlenmediği durumlarda da, direnç genlerinin tanınmasında kullanışlı olmaları beklenemez. Ayrıca, bir direnç geninin varlığı o genin ekspresyona uğrayacağı anlamına gelmez, bilinen bir direnç geninin yokluğu başka bir mekanizmaya dayanan farklı bir direncin olmadığını da göstermez. Fenotipik tiplendirme yöntemleri değişik gelişmişlik düzeylerindeki laboratuvarların çok çeşitli organizmaları test etmelerine, hem yeni gelişen hem de önceden varlığı belirlenen direnç paternlerini tanımlarına olanak sağlar. Sonuç olarak, antimikrobiyal direnç tanısında kullanılan moleküler yöntemler, konvansiyonel duyarlılık test yöntemlerine yardımcı olmaya devam edecekler ama çoğu klinik durumlar için bu yöntemlerin yerine geçmeyeceklerdir. Gelecekte, yüksek-dansiteli prob array ve DNA çip teknolojileri sayesinde amplifiye edilen üründe çok sayıda farklı mutasyonu tarama süreci kolaylaşacaktır.

Bu aşamada teknik detayların bir kısmı çözülmüş olduğu için, çoğu klinik laboratuvar moleküler yöntemleri rutin uygulamada kullanmaktadır, tartışılan noktalar ise testlerin maliyeti ve hasta bakımına olan potansiyel katkılarıdır. Günümüzde (managed care çağında) moleküler tanı yöntemlerinin kullanımıyla ilgili maliyet problemleri hastaneler ve laboratuvarlar açısından çok önemlidir. Hastanın durumunun iyileşmesi, antimikrobiyal harcamalarının azalması ve hastanede yatış süresinin kısılması, bu testlerin maliyetine karşılık gelse de, bu tip tasarrufların dökmante edilmesi zordur. Şu an için, moleküler tanı testlerine yönelik harcamaların haklı gösterilmesi tamamen spekülasyon aşamasındadır, cihaz maliyeti, reaktif ve personel harcamaları vardır ve yüksektir.

Ek olarak, moleküler tanı testleri için yeterli geri ödeme yapılmamaktadır. Enfeksiyon hastalıkları için yeni moleküler tanı testleri gündeme geldikçe, laboratuvarlar bu testlerin her birinin maliyet ve yararlarını değerlendireceklerdir. Bazı durumlarda, re-

ferans bir laboratuvar kullanmak en iyi seçenek olabilir. Nükleik asit dizi analizi yapmak için hazır kitler henüz bulunmasa da, hedef amplifikasyonu ile birleştirildiğinde, bu teknik daha önceden kültürle elde edilmeyen mikroorganizmalar için tanı seçeneği oluşturmada, antimikrobiyal direnç gen mutasyonlarını belirleyerek enfeksiyon hastalıklarının hem tanı hem de tedavisine yardımcı olmaktadır. Ayrıca, gen çip teknolojisi ve DNA dizi eşleştirmesi klinik laboratuvarlarda mikroorganizmaların karakterize edilmesi için büyük ümit vaat etmektedir.

### ÖNERİLEN KAYNAKLAR

- Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis of microorganisms. In: PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover, eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1999: 116-37.
- Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance using rapid DNA-based diagnostic tests. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19: 560-4.
- Cockerill FR III. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 199-212.
- Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: A reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:18-33.
- Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious disease. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475-88.
- Kant JA. Molecular diagnostics: Reimbursement and other selected financial issues. *Diagn Mol Path* 1995; 4: 79-81.
- Pfaller MA. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1007-10.
- Pfaller MA, Herwaldt LA. The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 858-70.
- Tung YW, Persing DH. Molecular detection and identification of microorganisms. In: PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover, eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1999: 215-44.
- Woods GL. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1002-6.
- Michael Pfaller, MD, is professor of pathology and public health at the University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Iowa. He is co-director of the Clinical Microbiology Laboratory, with research interests in the epidemiology of candidiasis and other nosocomial infections, antifungal therapy, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance.