

MOLEKÜLER TANI TESTLERİNİN DİRENÇ TAYİNİNDE KULLANIMI: GRAM NEGATİF BAKTERİLER İÇİN HIZLI MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

Özgen ESER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA
ozgen.eser@hacettepe.edu.tr

ÖZET

Dünyada her yıl 17 milyondan fazla insan, birçoğu bakteriyel kaynaklı olan infeksiyon hastalıklarından ölmektedir. Bakteriyel infeksiyonların kontrolü klinik mikrobiyoloji laboratuvarında etyolojik ajanın saptanma yeteneğine bağlıdır. Bakteriyel infeksiyonlarda uygun tedavi kararının verilmesi, bakteriyel patojenin saptanması, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasına bağlıdır. Ancak, tüm bu yöntemler zaman alıcı olmaları ve yüksek oranda manual işlem gerektirmeleri nedeniyle patojen temeline dayalı hasta yönetimini geciktirmektedir. Bu nedenle, bakteri türlerini hızlı ve doğru tanımlayacak yeni tanısal testlere gereksinim vardır. İnfeksiyon hastalıklarının moleküler tanısı, özellikle kullanılan nükleik asit temelli yöntemler, mikrobiyolojik tanıda en hızlı gelişen alanı oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar üzerine yapılan yaygın araştırmalar ve yakın zamandaki ilerlemeler, yeni nükleik asit temeline dayalı yöntemlerde olduğu gibi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında moleküler yöntemlerin artan oranda kullanımına neden olmuştur. Bu derleme, günümüzde kullanımda olan modern bakteriyolojik tanı yöntemlerini gözden geçirerek, Gram negatif bakterilerde tanımlama ve direnç saptanmasında kullanılan hızlı moleküler tekniklere dikkat çekmektedir. Sonuç olarak, mikrobiyoloji laboratuvarında moleküler yöntemlerin gelişmesi, yeni bir çağın başlamasına ve yanı sıra ekonomik tasarrufa neden olan, akılcı antibiyotik tedavisinin ortaya çıkışını sağlayan, hızlı patojen saptanmasına olanak sağlamasına rağmen, özgül duyarlılık sonuçlarını verememeleri bu yöntemlerin klinik kullanımını kısıtlamaktadır.

Anahtar sözcükler: hızlı moleküler tanı yöntemleri, nükleik asit amplifikasyon yöntemi, real-time PCR

SUMMARY

Molecular Diagnostic Tests in Determination of Resistance: Rapid Molecular Diagnostics for Gram Negative Bacteria

Infectious diseases are responsible for more than 17 million deaths worldwide each year, most of which are associated with bacterial infections. The control of bacterial infections is dependent on the ability to detect the aetiological agents in the clinical microbiology laboratory. Detection, identification and antibiotic susceptibility testing of bacterial pathogens provide important information towards adequate treatment decisions. Unfortunately, all these methods are time-consuming and highly manual procedures, which delay efficient, pathogen driven patient management. Thus, new diagnostic tests that could identify bacterial species rapidly and accurately are needed. Molecular diagnostics of infectious diseases, in particular, nucleic acid based methods are the fastest growing field in clinical laboratory diagnostics. Recent progress and extensive research on microbes as well as the development of new nucleic acid based methodologies have resulted in the increasing use of molecular assays in clinical laboratory. This review focuses on molecular techniques for identification and resistance determination in Gram negative bacteriology, giving a brief overview of currently used modern bacterial diagnostics. In conclusion, although the development of molecular assays opens up a new era in the microbiological laboratory and the rapid detection of a pathogen may allow better rational antibiotic therapy with possible economic savings, the lack of a specific susceptibility spectrum may limit the clinical usefulness of these assays.

Keywords: nucleic acid amplification technique, rapid molecular diagnostics, real-time PCR

Klinik mikrobiyoloji laboratuvar tanı testleri içinde infeksiyon hastalıkları tanısında kullanılmakta olan moleküler tanı yöntemleri ve özellikle nükleik asit temelli yöntemler, en hızlı ilerleme gösteren alanı oluşturmaktadır. Bu test-

ler zaman içerisinde mikrobiyoloji laboratuvarlarında kültür-temelli, biyokimyasal veya immünojenik yöntemleri tamamlama veya yerini alma rolünü üstlenmektedir. Nitekim ilk kuşak nükleik asit yöntemleri tıpkı konvansiyonel tanı yön-

temleri gibi tek bir test sonucu vermekteydi. Teknolojide gerçekleşen ilerleme ve yeni yaklaşımlar, "microarray", multipleks nükleik asit amplifikasyon teknikleri veya kütle spektrofotometri gibi aynı anda birçok parametreye ait sonuç verebilen yöntemlere olanak sağlamıştır. Bununla birlikte, bu yöntemler kapalı tüp sistemlerini de kullanıma sokarak hızlı mikrobiyal tanının yanı sıra, kontaminasyon riskinde azalmayı da beraberinde getirmiştir. Başlangıçta moleküler yöntemler mikrobiyal patojenlerin saptanması ve tanımlanmasında rol almış olsa da, yeni teknolojilerle birlikte bu yöntemler beraberinde çoklu antibiyotik direncini belirleyen parametreleri saptama ve genetik düzeyde mikrobiyal epidemiyoloji ve sürveyansı takip etme olanağına da zemin hazırlamaktadır⁽¹⁹⁾.

Klinik örneğin direkt mikroskopik incelemesi, insana patojen mikroorganizmaların saptanmasında en eski ve aynı zamanda en önemli yöntemler arasında yer almaktadır. Direkt mikroskopi, etkenin tanımlanması için en erken mikrobiyolojik öntanın belirlenmesinde anahtar rol oynamasına rağmen, bakterinin tür düzeyinde tanısını koymak için mutlaka örneğin uygun besiyerine ekimi ve sonrasında etkenin üretilmesi gerekmektedir. BacTec (Becton Dickinson, ABD), Vitek (bioMerieux, Fransa), Phoenix (Becton Dickinson, ABD) gibi otomatize sistemlerin devreye girmesi ile yöntemlerin standardizasyonu, kalite ve etkinliğinde artış sağlanmasına rağmen, hiç biri saf kültür elde edilme ihtiyacını ortadan kaldıramamıştır.

Sepsis hayatı tehdit eden, morbidite ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Sepsiste hipotansiyon gelişmesini takiben ilk altı saat sonrasında her saat başı ölüm riski % 7.6 oranında artış göstermektedir⁽⁷⁾. Bu nedenle etkenin erken tanısı antimikrobiyal tedaviye doğru şekilde karar verilmesinde en önemli gösterge olmaktadır⁽²³⁾. Etkenin izolasyon ve tanımlanmasına dayalı kan kültür yöntemi sepsis tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntem, kan kültür pozitiflik sinyali alındıktan sonra 1-3 gün gibi bir tanımlama sürecine ihtiyaç göstermektedir. Atipik ve zor üreyen bakterilerde ve antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılması halinde bu süre 1-2 gün daha uzamaktadır. Antimikrobiyal tedavi kararının doğru

verilmesinde çok önemli bir yol gösterici olan tüm bu işlemler zaman alıcı ve emek isteyen uğraşları gerektirmektedir. Yanlış tedavi sonucu hastanın yatış süresi uzamakta, sepsis komplikasyonları ortaya çıkmakta, antibiyotik direnci oluşmakta ve laboratuvar harcamaları artmaktadır. Bu nedenle, sepsis tanısında birçok mikroorganizmayı tür düzeyinde tanımlayabilecek hızlı ve doğru yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır⁽¹²⁾.

Moleküler teknikler, bakterinin türe özgül korunmuş gen bölgelerini tanımlayarak bakteriyeye ait genotipik özellikleri net olarak vermektedir. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin keşfi, kültüre gerek kalmaksızın mikroorganizmaları hızlı, özgül ve duyarlı olarak saptama, tanımlama ve direnç durumlarını belirleme imkanı sağlamıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) nükleik asit tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. PCR, DNA varlığını saptamaya yönelik bir yöntem olması nedeniyle hem canlı hem ölü hücreden kaynaklanan pozitif test sonucu verebilmektedir. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde nükleik asit kalitesinin yeterli olmaması özgül olmayan primer birleşmesine neden olarak sonucun yanlış değerlendirilmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle, yeni amplifikasyon temelli yöntemler çoğaltılacak hedef molekülü özgül olarak saptamak ve tanımlamak amacıyla özgül hibridizasyon problemlerini kullanmaktadır^(5,17).

Multipleks ve real-time PCR temelli yöntemler

Floresan işaretli problemlerin kullanıldığı real-time PCR, moleküler yöntemlerin önünü açmıştır. Bu yöntem, önceleri aynı test içinde tek nükleotid polimorfizmleri gibi genetik varyasyonları bir seri özgül prob kullanımı ile kantite etme ve genotipleme imkanı veren tek parametrelili testler olarak uygulamaya girmiştir. Çok parametreye dayalı PCR yöntemleri ise, ilk defa kan yolu infeksiyonlarının tanısında ortaya çıkmış, 40 farklı bakteri ve mantar patojeninin doğrudan kan örneğinden tanımlanmasını sağlamıştır. Böylece, tanısal olarak düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip kan kültürü yönteminin yerini alarak daha duyarlı, daha özgül ve daha kısa sürede örnekten doğrudan mikrobiyal patojenin tanısına olanak doğurmuştur. Bu yöntemler her bir patojen için özgül primer setinin kul-

lanımı sonucu farklı hedeflerin bir tüp içerisinde aynı anda amplifikasyonuna dayalı multipleks PCR prensibine dayanmaktadır. LOOXTER/VYOO (Sirs-Lab, Almanya) ve Septi-Test Blood (Molzyme, Almanya) sistemleri "microarray" ile hibridizasyon veya agaroz jel elektroforez ile özgül PCR ürünlerinin sırayla tanımlanmasını sağlayan konvansiyonel multipleks PCR yöntemleridir. Floresan ve erime eğrisi analizi ile real-time PCR LightCycler teknolojisine dayalı Septi-Fast (Roche Diagnostics, Almanya) sistemi ise, bakteri tanımlamasını tür veya cins düzeyinde gerçekleştirmektedir. Her üç yöntem de doğrudan kan örneğinden analiz yapma imkanı sunmaktadır.

Septi-Fast

Septi-Fast, on farklı bakteriyi tür düzeyinde, yedisini cins düzeyinde, yanı sıra beş *Candida* türü ile *Aspergillus fumigatus*'u tanımlayan kantitatif olmayan real-time PCR yöntemidir. Bu yöntem özellikle sepsisten % 90 üzerinde sorumlu olan ve kültürü yapılabilen 25 mikroorganizmayı tanımlayabilmektedir⁽⁹⁾. Bunlar arasında yer alan Gram negatif bakteriler *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'dır. Kültürü yapılamayan veya zor üreyen mikroorganizmaları tanımlama özelliği yoktur. Septi-Fast, 1.5 ml tam kandan seramik boncuklarla mekanik ekstraksiyon yaparak spin-kolon temelli nükleik asit saflaştırma yöntemi kullanmaktadır. Bu yöntemde, insan DNA'sı patojen DNA'sı ile birlikte izole edilmektedir. Septi-Fast kan dışında plevral sıvı, periton sıvısı gibi örneklerde Gram negatif bakterilere bağlı pyojenik infeksiyonların tanısını koymada hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır⁽¹⁵⁾.

Septi-Fast, antibiyotik tedavisi alan hastalarda kan kültür sonucuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek pozitiflik göstermektedir. Diğer yandan, Septi-Fast'in saptamadığı mikroorganizmaların kültürde saptanması da söz konusu olabilmektedir. Bunun nedeni, kan kültüründe çok daha yüksek kan hacminin kullanımına bağlı izolasyon oranının

artması ve Septi-Fast yöntemi ile saptanamayan sepsise neden olan bazı bakteri türlerinin kan kültürü ile tanımlanabilmesidir. Septi-Fast 3-30 cfu/ml gibi düşük sınırlar mikroorganizma tanımlama imkanı sağlamaktadır. Septi-Fast yöntemi 6 saat gibi kısa sürede analize olanak sağlamakla birlikte, örnek naklinden test sonucuna kadar geçen süre 27 saati bulmaktadır⁽¹¹⁾. Buna rağmen, kan kültürüne göre daha hızlı sonuç vermektedir. Septi-Fast ayrıca, kan kültürüne göre daha az kontaminasyon oranına sahiptir⁽¹⁰⁾.

Septi-Test

İnsan DNA'sının patojen DNA'sı ile birlikte izole edilmesi PCR için inhibitör etki göstermektedir. MolZym ürünü olan Septi-Test insan DNA'sını ortadan kaldırmak için DNaz ile muamele etmektedir. Yöntem, mikroorganizma tanısında 16S ribozomal DNA amplifikasyonu ve dizi analizi kullanmaktadır. Septi-Test 50 cfu/ml'e kadar kanda mikroorganizma varlığını saptayabilmektedir. Yöntemin bir dezavantajı, hücre içi yerleşimli bakterilerin insan lökosit DNA'sı yıkımı ile kaybedilmesidir. Septi-Test, 114 farklı Gram negatif bakteri türünü tanımlayabilmektedir. Bunlar arasında *Acinetobacter*, *E.coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Vibrio* türleri bulunmaktadır. Test için örneğin laboratuvara ulaşımı ile sonuç verilmesi arasındaki süre 8-12 saat kadardır. Sonuç verme süresinin uzun olması ve yanlış pozitiflik oranlarının yüksek oluşu hızlı tanı için klinik yararlılığını düşüren özelliklerdir^(14,22).

Hyplex BloodScreen

Hyplex BloodScreen (BAG, Almanya) hem Gram pozitif hem Gram negatif paneli ile 10 farklı bakteri türünü tanımlayabilmektedir. Bu yöntemde bakteriyel DNA'nın multipleks PCR ile amplifikasyonunu takiben, ELISA'ya benzer bir biçimde özgül oligonükleotit problemleri ile kaplı mikroplak çukurlarına PCR ürününün hibridizasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem pozitif kan kültürlerinde uygulanmakta olup test süresi 3 saat civarındadır. Gram negatif panelde *E.coli*, *P.aeruginosa*, *E.aerogenes*, *Klebsiella* spp. bulunmaktadır. Farklı bakteri türlerinde % 96.6-100 arasında değişen duyarlılık, % 92.5-100 arasında değişen özgüllük göstermekte-

dir⁽²¹⁾. Hyplex, aynı test temeline dayalı olarak geliştirilmiş, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, metallo-beta-laktamaz, oksa-karba-penemaz üreten bakterilerin tanımlanmasında ve *Clostridium difficile* tanısında kullanılan ayrı ürün yelpazesine sahiptir.

“Microarray” yöntemleri

Özgül hibridizasyon problemlerinin katı bir faza tutturularak işaretli hedef molekülleri saptamaya yönelik olan katı faz hibridizasyon yöntemi, ilk kullanıldıklarında mikroplak çukurlarında immobilize edilen özgül problemlerin tek bir parametreyi saptama ve tanımlamasına yönelik olarak geliştirilmiştir. Daha sonra çoklu problemlerin nitroselülöz veya naylon membranlara tutturulması ile “macroarray” yöntemleri ortaya çıkmıştır. Microarraylerin 200-300 µm çapından daha küçük noktalar halinde hazırlanması ile bakteriyel menenjit, solunum sistemi infeksiyonu ve endokardit gibi hastalıkların tanısında hızlı, duyarlı ve özgül tanı imkanı doğmuştur.

LOOXTER/VYOO

SIRS-Lab ürünü olan LOOXTER/VYOO kullanmak suretiyle insan DNA’sı ile bakteri DNA’sı arasındaki metilasyon farkı nedeniyle afinite kromatografi tekniği ile patojen DNA’sını yoğunlaştırarak 16S rRNA amplifikasyonu yapan bir yöntemdir. Yöntem, % 90 oranında ökaryotik DNA’yı uzaklaştırma imkanı sağlar. Amplifikasyonu takiben uygulanan “microarray” yöntemi PCR sonuçlarını okuyarak patojenleri tür düzeyinde tanımlamaktadır. Test için kullanılan kan örnek hacmi 5 ml olan LOOXTER/VYOO, 34 farklı bakteri, 6 *Candida* türünü, *A.fumigatus* ile beş farklı antibiyotik direnç determinantını tanımlayabilmektedir. Yöntemin tanımladığı Gram negatif bakteriler arasında *A.baumannii*, *Bacteriodes fragilis*, *Burkholderia fragilis*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *E.coli*, *Haemophilus influenzae*, *K.oxytoca*, *K.pneumoniae*, *Morganella morgani*, *Neisseria meningitidis*, *P.mirabilis*, *Paeruginosa*, *S.marcescens*, *S.maltophilia*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica* bulunmaktadır. Yöntem 8 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve örnekte 3-30 cfu/ml düzeyinde bulunan patojeni tanımlama duyarlılığı göstermektedir^(4,6,22).

Prove-it Sepsis

Prove-it Sepsis (Mobidiag, Finlandiya), multipleks PCR ve microarray temeline dayalı olan yöntem 60 bakteri, 13 mantar türü ile *mecA-vanA/B* direnç genlerini tanımlama özelliğine sahiptir^(3,8). Tanımlamada Gram negatif bakteriler arasında *A.baumannii*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *E.coli*, *H.influenzae*, *Kingella kingae*, *K.oxytoca*, *K.pneumoniae*, *N.meningitidis*, *P.mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Paeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S.marcescens*, *S.maltophilia*, *B.fragilis*, *Campylobacter jejuni* yer almaktadır. Klinik olarak şüpheli sepsis tanısı olan 3318 hastada yapılan bir araştırmada Prove-it Sepsis % 94.7 duyarlılık, % 95.7 özgüllüğe sahip bulunmuştur. Bu yöntem pozitif kan kültür örneklerinde analiz yapma imkanı sunmaktadır. Yöntemin sonuç verme süresi 3 saattir⁽¹⁸⁾.

Proteomik temelli teknolojiler

“Matrix associated laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)”, bakterileri proteomik profillerini belirleyerek tanımlamaktadır. Bunun yanı sıra, bakteri virulans faktörleri veya antibiyotik direncini de tanımlayabilme özelliğine sahiptir. Birkaç dakika içinde izole edilen mikroorganizmanın tanımlanması veya tiplendirilmesi gerçekleştirilebilmektedir. Kültür sonrası bakteri tanımlanmasında % 95.4 oranında duyarlılık göstermektedir⁽¹⁶⁾. Kısıtlayıcı özelliği doğrudan klinik örneklerle uygulanamaması ve analiz için bakterinin kültürüne ihtiyaç duyulmasıdır. Son derece pahalı olması rutin kullanımını engellemektedir. Ancak, kütle spektrofotometrik teknikler nükleik asit temelli yöntemler ile birlikte kullanılarak amplikonların hızlı dizi analizi sonucuna ulaşılmasını sağlayabilmektedir. MALDI-MS veya “electrospray ionization mass spectrophometry (ESI-MS)” bu amaçla kullanıma girmeyi vadeden yöntemlerdir⁽²⁾. MALDIBiotyper/Sepsityper (Bruker, Finlandiya) benzer şekilde, Gram pozitif bakterilerin yanı sıra non-fermentatif bakteriler, *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanılan yeni, hızlı, duyarlı ve ekonomik yeni moleküler rutin tanımlama yöntemidir⁽¹⁾.

Amplifikasyona dayalı olmayan nükleik asit temelli yöntemler

Kültür pozitifliği sonrasında, bakterinin konvansiyonel fenotipik testlerden daha hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlayacak moleküler yöntemlerden biri de peptit ve/veya nükleik asit problemleri ile tanısının konulmasıdır⁽¹³⁾. "Fluorescent-labeled peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA-FISH)" (AdvanDx, ABD), DNA'yı taklit eden floresan ile işaretli peptit nükleik asit moleküllerinin kullanılması ile bakterilerin rRNA genlerini hedefleyen problemlerden oluşmaktadır. Bu problemler klasik DNA problemlerine göre daha güçlü hibridizasyon özelliği göstermektedir. Konvansiyonel FISH yöntemine benzer şekilde amplifikasyon basamağını atlayarak mikroorganizmaları rRNA genlerini tespit ederek saptayabilmektedir. Gram negatif bakteriler için *E.coli* ve *Paeruginosa* gibi sınırlı sayıda bakteriyi tanımlayan floresan in situ hibridizasyon temelli yöntem, 3 saat gibi kısa sürede test sonucu verebilmektedir⁽²⁰⁾.

Sonuç

Sonuç olarak, hızlı moleküler tekniklerin rutin bakteriyoloji laboratuvarında kullanımı, bu yöntemlerin doğrudan klinik örnekten bakteriyel patojenin saptanmasına yönelik hızlı ve duyarlı sonuç vermeleri nedeniyle, yeni bir çağın başlamasına yol açmıştır. Ancak, bu yöntemlerin, patojenin antimikrobiyal duyarlılık sonuçları hakkında bilgi vermede yetersiz kalması nedeniyle, konvansiyonel kültür yöntemlerinin yerini alması zaman alacaktır. Bunun yanı sıra, bu yöntemlerin çok pahalı oluşu günümüz koşullarında rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımını kısıtlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Buchan B, Riebe KM, Ledebner NA. Comparison of the MALDI Biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles, *J Clin Microbiol* 2012; 50(2):346-52.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05021-11>
PMid:22162549
2. Ecker DJ, Sampath R, Li H et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infection, *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(4):399-415.
<http://dx.doi.org/10.1586/erm.10.24>
PMid:20465496
3. Gaibani P, Rossini G, Ambretti S et al. Blood culture systems: rapid detection-how and why? *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(Suppl 4):513-5.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70559-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70559-X)
4. 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;47(8):229-31.
5. Hansen WL, Beuving J, Bruggeman CA, Wolffs PF. Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures, *J Clin Microbiol* 2010;48(12): 4432-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00562-10>
PMid:20962139 PMCID:3008471
6. Hansen WL, Bruggeman CA, Wolffs PF. Evaluation of new preanalysis sample treatment tools and DNA isolation protocols to improve bacterial pathogen detection in whole blood, *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2629-31.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00821-09>
PMid:19535529 PMCID:2725680
7. Kumar A, Roberts D, Wood KE et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock, *Crit Care Med* 2006;34(6):1589-96.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>
PMid:16625125
8. Laakso S, Kirveskari J, Tissari P et al. Evaluation of high-throughput PCR and microarray-based assay in conjunction with automated DNA extraction instruments for diagnosis of sepsis, *PLoS One* 2011;6(11):1-8.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026655>
PMid:22132076 PMCID:3222647
9. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T 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):313-24.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00430-007-0063-0>
PMid:18008085
10. Lilienfeld-Total M, Lehmann LE, Raadts AD et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia, *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2405-10.

- <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00491-09>
PMid:19571034 PMCID:2725651
11. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis, *J Clin Microbiol* 2011; 49(6):2252-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02460-10>
PMid:21471340 PMCID:3122766
 12. Mancini N, Carletti, Ghidoli N et al. The era of molecular and other non-culture based methods in diagnosis of sepsis, *Clin Microbiol Rev* 2010;23(1):235-51.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00043-09>
PMid:20065332 PMCID:2806664
 13. Morgan M, Marlowe E, Della-Latta P et al. Multicenter evaluation of a new shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization procedure for species identification of select gram negative bacilli from blood cultures, *J Clin Microb* 2010;48(6): 268-70.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00166-10>
PMid:20357212 PMCID:2884511
 14. Muhl H, Kochem AJ, Disque C, Sakka SG. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66(1):41-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.011>
PMid:18722072
 15. Sancho-Tello S, Bravo D, Borrás R et al. Performance of the light-cycler Septi-Fast test M in detecting microbial pathogens in purulent fluids, *J Clin Microbiol* 2011;49(8):2988-91.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00359-11>
PMid:21715593 PMCID:3147784
 16. Seng P, Drancourt M, Gouriet F et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, *Clin Infect Dis* 2009;49(4):543-51.
<http://dx.doi.org/10.1086/600885>
PMid:19583519
 17. Simons G. Applications of nucleic acids technologies in molecular diagnostics; multiplex assays in real-time format, *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10(7):853-5.
<http://dx.doi.org/10.1586/erm.10.78>
PMid:20964604
 18. Tissari P, Zumla A, Tarkka E et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study, *Lancet* 2010;375(9710):224-30.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61569-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61569-5)
 19. Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology, *Anal Bioanal Chem* 2009;394(3):731-42.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2779-8>
PMid:19377839
 20. Wellinghausen N, Kochem AJ, Disque C et al. Diagnosis of bacteremia in whole blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis, *J Clin Microbiol* 2009;47(9):2759-65.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00567-09>
PMid:19571030 PMCID:2738079
 21. Wellinghausen N, Nöckler K, Sigge A et al. Rapid detection of *Brucella* spp in blood cultures by fluorescence in situ hybridization, *J Clin Microbiol* 2006;44(5):1828-30.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.5.1828-1830.2006>
PMid:16672413 PMCID:1479171
 22. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A et al. Evaluation of the Hyplex bloodscreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram positive cocci and gram negative bacilli from positive blood cultures, *J Clin Microbiol* 2004;42(7):3147-52.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.3147-3152.2004>
PMid:15243074 PMCID:446249
 23. Won H, Rothman R, Ramachandran P et al. Rapid identification of bacterial pathogens in positive blood culture bottles by use of a broad-based PCR assay coupled with high-resolution melt analysis, *J Clin Microbiol* 2010;48(9):3410-3.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00718-10>
PMid:20631110 PMCID:2937718

Eş Zamanlı Oturum: Panel 4 sunuları

ÇOCUKLARDA AKUT TONSİLLOFARENJİT VE OTİTİN TANI VE TEDAVİSİNDE GÜNCELLEME

Yöneten: **Ateş KARA**

- Çocuklarda akut tonsillofarenjit ve orta kulak iltihabı: Etkenler ve mikrobiyolojik tanı
Derya AYDIN
- Çocuklarda streptokoksik tonsillofarenjit
İsmail YILDIZ, Emin ÜNÜVAR
- Akut orta kulak iltihabı tanısı ve tedavisi
Ahmet SOYSAL