

## Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolü nasıl yapılır?

### How to control of the workspace environment in the molecular microbiology laboratory?

Dilek GÜLDEMİR<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında in-vitro amplifikasyon reaksiyonu (IVAR, İn vitro Amplifikasyon Reaksiyonları) ürünleri ile çapraz kontaminasyon, çalşılan testlerde yanlış pozitifliğe neden olabilir. Bu durum, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında çok ciddi bir problemdir. Günümüzde moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında iyi klinik laboratuvar uygulamaları (GCLP, Good Clinical Laboratory Practice) ile ilgili pek çok kaynak mevcut olmasına rağmen ortam kontrolünün nasıl yapılacağı hususunda halen özgün araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolünün nasıl yapılabileceği konusunda edindiğimiz tecrübeleri paylaşmaktır.

**Yöntem:** Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığına bağlı, "Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı (UMMRL)"nda, TS EN ISO 15189 standardına dayalı kalite yönetim sistemi (KYS) kapsamındaki, kalite ve akreditasyon çalışmalarında ilk kez moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolünün nasıl yapılacağı hususu ele alınmış ve laboratuvar koşullarında optimize edilmiştir. Söz konusu çalışmalar; laboratuvar güvenliğine

#### ABSTRACT

**Objective:** Cross-contamination with the product of "in vitro amplification reactions (IVAR)" can cause false positive results in laboratory tests. This study is a more seriously problem for molecular microbiology laboratories. In the recent, although many sources can be obtained about good clinical laboratory practices (GCLP) for molecular microbiology laboratories, specific research is needed how to control of the workspace environment. The aim of this study, it is shared our laboratory experiences about control of the workspace environment for molecular microbiology laboratories.

**Methods:** In the scope of the quality management system (QMS) based on TS EN ISO 15189 standard in "Public Health General Directorate, Department of Microbiology Reference Laboratories, National Molecular Microbiology Referans Laboratory (NMMRL)", it was dealt how to control of the work space environment in the molecular microbiology laboratory for the first time, and it was optimized in the laboratory conditions. These experiments were conducted in accordance with laboratory safety and as a result an instruction (coded ÇT03 / MRLDB-06, dated 15.11.2014/01) was formed. In this instruction,

<sup>1</sup>Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Dilek GÜLDEMİR

Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok, 1. kat, Sıhhiye 06100 Ankara - Türkiye

Tel : +90 505 261 74 79

E-posta / E-mail : dilekg06@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 28.02.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 22.03.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.83713

Güldemir D. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolü nasıl yapılır?  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(2): 135-142

uygun olacak şekilde yürütülmüş ve sonuç olarak bir talimat (ÇT03/MRLDB-06 kodlu ve 15.11.2014/01 tarihli) haline getirilmiştir. Bu talimatta, laboratuvarımızdaki çalışma ortamının kontrolü için, dokuz alan belirlenmiş, bu alanlardan ne şekilde örnek alınacağı, bu örneklerin nasıl test edileceği, sonuçların nasıl değerlendirileceği ve kayıt edileceği detaylı bir şekilde tarif edilmiştir. Seçilen alanlardan alınan örnekler, laboratuvarımızda optimize edilen sekans bazlı 16S rRNA testi ile analiz edilmiştir.

**Bulgular:** ÇT03/MRLDB-06 talimatı uyarınca, UMMRL'deki TS EN ISO 15189 standardına dayalı KYS kapsamındaki ortam kontrolü çalışmalarında, UMMRL'deki ortam kontrolü incelemelerinde, seçili alanlardan alınan örneklerin hiçbirinde nükleik asit kontaminasyonuna rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar, ilgili kalite formları kullanılarak kayıt altına alınmıştır.

**Sonuç:** Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında çapraz bulaş ya da nükleik asit kontaminasyonunun önlenmesi için periyodik olarak ortam kontrolünün yapılması gereklidir. Günümüzde IVAR ürünlerinin kontrolü giderek önem kazanmakta ve laboratuvar akreditasyon kuruluşları sertifikasyon için klinik laboratuvarlarda, ortam kontrolünün sağlanmasını istemektedirler. Bu çalışmanın, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında ortam kontrolü ve laboratuvar güvenliği konularını ele alınırken ve bu konularda kendi ihtiyaçlarına yönelik talimatlar oluşturulurken yararlı olabileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** çapraz kontaminasyon, ortam kontrolü, yanlış pozitiflik

nine areas have been identified in our laboratory for the control of the laboratory workspace environment, how these samples will be taken from these areas, how these samples will be tested, how the results will be assessed and how they will be recorded have been described in detail. The samples from the selected areas were analyzed with the sequence-based 16S rRNA assay optimized in our laboratory.

**Results:** According to the instructions of ÇT03 / MRLDB-06 within the scope of QMS based on TS EN ISO 15189 standard, nucleic acid contamination were not found in none of the samples taken from selected areas in NMMRL workspace environment control studies. The results obtained are recorded using the relevant quality forms.

**Conclusion:** Periodic control of the workspace environment in the molecular microbiology laboratory is required to prevent cross contamination or nucleic acid contamination. Today, control of IVAR products is getting more and more important, and laboratory accreditation organizations demand the control of the workspace environment in clinical laboratories for certification. We believe that this study can be useful when discussing workspace environment control and laboratory safety issues in molecular microbiology laboratories and preparing instructions for their own needs in this regard.

**Key Words:** cross contamination, control of the workspace environment, false positives

## GİRİŞ

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan başta polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) olmak üzere mikroorganizmaların hedef bölgelerini çoğaltmaya yönelik IVAR teknikleri, çalışma ortamının kontaminasyonuna neden olabilir (1). Özellikle PZR amplifikasyonu sonrası, ürünün görüntülenmesi işlemi sırasında amplikonlar ortama saçılırlar. Bu şekilde çalışma alanı nükleik asitlerle (çapraz

amplikon) kontamine olur. Burada ortaya çıkan kontaminasyon testlerimizde yanlış pozitifliğe neden olabilir, bu olay çapraz bulaş ya da kontaminasyon olarak adlandırılmakta olup, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında çok ciddi bir problemdir (1-4).

Ülkemizde, ilk kez 09 Mart 2010 tarihinde yayınlanan 27516 sayılı Yönetmelik ile "İyi Laboratuvar Uygulamaları (İLU)-Good Laboratory Practice (GLP);

klirik çalışmalar dışındaki sağlık ve çevre güvenliği çalışmalarının planlanması, yapılması, izlenmesi, kaydedilmesi, arşivlenmesi ve rapor edilmesi şartlarını ve yönetim usullerini içeren bir kalite güvence sistemi” olarak tarif edilmiş olup; denetimi “Ulusal İzleme Mercii” olarak Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) tarafından yapılmaktadır (5).

Genel olarak ülkemizde, İLU'nun tıbbi laboratuvar uygulamalarını da kapsadığı kanaati yaygındır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2003 yılında, klinik laboratuvarlar için “*Good Clinical Laboratory Practice (GCLP)*” yani iyi klinik laboratuvar uygulamaları rehberini yayınlamıştır (6). Ülkemizde de klinik laboratuvarlar için GCLP ile uyumlu mevzuat çalışmalarına ve rehberlere ihtiyaç duyulduğu aşikardır. Esasen organizasyon ve personel sorumlulukları ile kalite politikası ve standartları gibi genel prensiplerinin tarif edildiği GCLP’de yer alan ilkeler, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarları için de geçerlidir. Ancak, bunlara ilaveten alınması gereken ve moleküler tabanlı testlere spesifik bazı önlem ve düzenlemeler mevcuttur (1, 7).

Nükleik asitler ile çapraz bulaşı önlemek veya en aza indirmek üzere moleküler mikrobiyoloji laboratuvarları için tarif edilen GCLP uygulamalarına riayet edilmesine rağmen, ortam kontaminasyonu yine de ortaya çıkabilmektedir. Günümüzde in vitro amplifikasyon reaksiyonu ürünlerinin kontrolü konusu giderek önem kazanmaktadır. Laboratuvar akreditasyon kuruluşları, sertifikasyon için klinik laboratuvarlarda ortam kontrolünün sağlanmasını istemektedirler. Ancak moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında ortam kontrolünün nasıl yapılacağı konusunda özgün araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (1). Bu çalışmanın amacı, bir moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolü yapılırken nasıl bir yol izlenebileceği ile ilgili tecrübelerimizin paylaşılmasıdır.

### GEREÇ ve YÖNTEM

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığına bağlı, “Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji

Referans Laboratuvarı (UMMRL)”de TS EN ISO 15189 standardına dayalı KYS kapsamında hazırlanan ÇT03/MRLDB-06 kodlu ve 15.11.2014/01 tarihli Biyogüvenlik Çalışma Talimatı dökümanında, ilk kez moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolünün nasıl yapılacağı hususu ele alınmıştır. Bu talimat, laboratuvar güvenliğine uygun olarak yürütülen optimizasyon çalışmaları sonucunda oluşturulmuştur. Biyogüvenlik Çalışma Talimatında, UMMRL çalışma ortamının kontrolü için dokuz farklı alan belirlenmiş olup, bu alanlardan hangi aralıklarla ve ne şekilde örnek alınacağı, örneklerin nasıl test edileceği, sonuçların nasıl değerlendirileceği ve kayıt altına alınacağı detaylı bir şekilde tarif edilmiştir. Ayrıca laboratuvarın rutin temizliği ile dekontaminasyonunun nasıl yapılacağı, ultraviyole (UV) lamba kullanımı ve etkinlik izlemesi ile ilgili detaylara da yer verilmiştir.

Ortam kontrolü çalışmasında, öncelikle laboratuvarında hangi alanların seçilmesi gerektiği konusu araştırılmış ve ardından öncelikli alanlar belirlenmiştir. Bu kapsamda, öncelikli alanlar arasında PZR kabinleri, biyogüvenlik kabinleri, masa ve tezgâh üstleri yer almıştır. UMMRL’de, ortamın nükleik asitler ile kontaminasyonun kontrol edileceği alanlar belirlenmiş ve ilgili talimatın 2.5-2.13 maddelerinde tanımlanmıştır. Bu alanlar; 1-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi Laboratuvarı-Biyogüvenlik Kabini (RFLP-BGK), 2-Pulsed Field Jel Elektroferez Laboratuvarı-Biyogüvenlik Kabini (PFGE-BGK), 3-Nükleik Asit Ekstraksiyon Laboratuvarı-Biyogüvenlik Kabini (NAE-BGK), 4-Nükleik Asit Ekstraksiyon Laboratuvarı-Tezgah Üstü (NAE-TÜ), 5-DNA Dizi Analizi Laboratuvarı-Tezgah Üstü (DNA SEQ-TÜ), 6-Temiz Oda-PZR Kabini 1/Sağ (Temiz Oda-PZR-1), 7-Temiz Oda-PZR Kabini 2/Sol (Temiz Oda-PZR-2), 8-Nükleik Asit Amplifikasyon Laboratuvarı-PZR Kabini (NAA-PZR), 9-Nükleik Asit Amplifikasyon Laboratuvarı-Tezgah Üstü (NAA-TÜ) olarak talimatta yer almıştır.

Çeşitli uluslararası otoriteler, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında ortam kontrollerinin belirli aralıklarla periyodik olarak yapılması, bu aralıkların süresine, laboratuvarın iş yüküne ve çalıştığı

etkenlere göre laboratuvar tarafından karar verilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Laboratuvarımızdaki mevcut koşullar dahilinde, ortam kontrolünün üç ayda bir yapılması uygun görülmüştür. Steril sentetik bir silgiç yardımıyla yukarıda belirtilen (1-9) alanlardan örnek alınmıştır. Alınan örneklerde, nükleik asit arandığı için herhangi bir ekstraksiyon işlemine tabi tutulmamıştır. Tüm ortamlardan alınan örnekler, sekans bazlı 16S rRNA PZR yöntemi ile amplifiye edilerek ortamda bakteri DNA bulunup bulunmadığı test edilmiştir. Testte kullanılan primerler ve bunlara ait oligonükleotit dizileri Tablo 1’de gösterilmiştir.

16S rRNA bölgesi bakterilerde ortak gen bölgesi olup, esasen klinik örneklerde bakteri varlığını göstermek ve ardından DNA dizi analizi ile saptanan bakteriyi tanımlamak amacı ile kullanılmaktadır (14). Laboratuvarımızda da esasen steril vücut sıvılarında bakteri araştırmak ve tanımlanmasında sorun yaşanan ya da doğrulanması gereken suşları tanımlamak amacıyla optimize edilmiştir. Ortak gen bölgesi hedeflerini tanıma kabiliyeti ve yüksek

duyarlılığı nedeniyle bu yöntemin, ortam kontrolü çalışmalarında, kullanışlı olacağı düşünülmüştür. Optimize ettiğimiz 16S rRNA PZR amplifikasyonu yönteminde; total 50 µL reaksiyon hacmi içerisine 2X PZR Master Miks (Thermo Scientific DreamTaq Green PZR Master Mix, Life Technologies; USA) ve 20 pmol primer (her biri) ve 5 µL kalıp DNA ilave edilmiştir. Isı döngüleri; 95 °C’de 15 dk. ilk denatürasyonu takiben, 40 siklus 94 °C’de 45 sn. denatürasyon, 58 °C’de 45 sn. bağlanma, 72 °C’de 1 dk. uzama ve son olarak 72 °C’de 10 dk. son uzama şeklindedir. Amplifikasyon ürünleri 0,5 µg/mL etidyum bromid boyası ilave edilmiş ve %2’lik agaroz jel kullanılarak görüntülenmiştir.

Sonuçlar değerlendirilerek ortam kontrolü formuna işlenmiştir. ÇT03/MRLDB-06; (i) tüm örneklerden elde edilen sonuçların negatif olması ile ortamın çalışma için uygun olduğu sonucuna varılacağı, (ii) araştırılan ortamların bir ya da daha fazlasında DNA/RNA varlığı saptanması durumunda nasıl bir yol izleneceği ve (iii) ortam temizliği ile ara kontrollerin nasıl yapılacağı konuları da detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

**Tablo 1.** 16S rRNA genini hedef alan primerler ve oligonükleotit dizileri

Primerler*	5’-3’ oligonükleotit dizisi	Hedef organizma	Kaynak numarası
27F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	Bakteri	(8)
355F	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Bakteri	(9)
533F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	Bakteri, Archaea ve Eukarya	(10)
930F	TCAAAGAATTGACGGGGGC	Bakteri	(11)
515R	TTACCGCGCKGCTGGCAC	Bakteri, Archaea ve Eukarya	(10)
787R	GGACTACCAGGTATCTAAT	Bakteri	(12)
1391R	TGACGGGCGGTGWGTRCA	Bakteri, Archaea ve Eukarya	(10)
1492R	GGTACCTTGTACGACTT	Bakteri, Archaea ve Eukarya	(13)

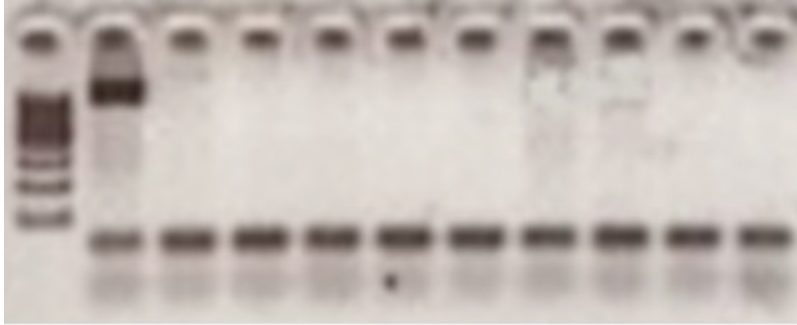
\*: 16S rRNA genini hedef alan primerler (F, forward; R, reverse).

## BULGULAR

Laboratuvar çalışma ortamının kontrolü için laboratuvarımızda, RFLP-BGK (1), PFGE-BGK (2), NAE-BGK (3), NAE-TÜ (4), DNA SEQ-TÜ (5), Temiz Oda-PZR-1 (6), Temiz Oda-PZR-2 (7), NAA-PZR (8), NAA-TÜ (9) olarak toplam dokuz (9) alan belirlenmiştir. Tüm ortamlardan alınan örnekler, 16S rRNA ile

amplifiye edilerek ortamda bakteri DNA'sının bulunup bulunmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 1). Yapılan kontrollerin hiçbirinde ortamda mikroorganizma kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. Elde edilen sonuçlar ortam kontrolü formuna işlenmiştir (Tablo 2).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Şekil 1. Ortam kontrolü çalışması örneği-16S rRNA PCR amplifikasyonu

M: Moleküler ağırlık belirteci, 1000 bp, 1: Pozitif Kontrol, 2-10: Ortam kontrolü için seçilen alanlardan alınan örneklerle yapılan 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları. Şekilde 2-10. çukurcuklarda sonuçların negatif olduğu yani ortamda kontaminasyona rastlanmadığı görülmektedir.

Tablo 2. Ortam Kontrolü Formu Kayıt Örneği

Kontrol Tarihi	Kontrol Edilen Yer/Alan	Kontrol Yöntemi	Sonuç*	Yorum**	Kontrol Eden***
15.03.2017	RFLP-BGK (1)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	PFGE-BGK (2)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	NAE-BGK (3)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	NAE-TÜ (4)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	DNA SEQ-TÜ (5)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	Temiz Oda-PZR-1 (6)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	Temiz Oda-PZR-2 (7)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	NAA-PZR (8)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG
15.03.2017	NAA-TÜ (9)	16S rRNA	Negatif	Uygun	DG

\*: Pozitif (Kontrol edilen yer/alanda kontaminasyon mevcuttur) / Negatif (Kontrol edilen yer/alanda kontaminasyona rastlanılmamıştır). \*\*: Uygun (Ortam kontrolü sonuçları laboratuvar çalışmalarının yürütülmesi için uygun bulunmuştur) / Uygun değil (Ortam kontrolü sonuçları laboratuvar çalışmalarının yürütülmesi için uygun bulunmamıştır). \*\*\*: Ortam kontrolünü yapan/onaylayan kişinin, ismi/isminin kısaltması/izması/parafı.

### TARTIŞMA

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan in-vitro amplifikasyon tekniklerinin çapraz bulaşa neden olabileceği konusu uzun zamandır bilinmekte olup, bunu önlemek ya da en aza indirmek için ne tür önlemler alınması ya da düzenlemeler yapılması gerektiği konusunun gündeme gelmesi ise PZR tekniğinin kullanıma girmesiyle neredeyse paraleldir. Testlerde yanlış pozitifliğe yol açan çapraz bulaş, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında çok ciddi bir problemdir. Çünkü (i) PZR gibi testlerde hedef molekülün siklus sayısına göre yaklaşık  $n^{35-40}$  kopyası üretilir ve (ii) testlerin duyarlılığı oldukça yüksektir (1-4). İşte bu nedenlerle, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında gerekli tedbirler alınmazsa, çapraz bulaş kaçınılmaz bir sonuçtur. Dahası ortamın çapraz amplikonlarla kontamine olması, laboratuvarında çalışılan tüm IVAR testlerinde yanlış pozitifliğe neden olabileceğinden laboratuvarın faaliyetinin durdurulmasını gerektirir.

Çapraz bulaş problemini önlemek için moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında GCLP’de yer alan genel prensiplere ilave tedbirler alınmalıdır. Bu sayede, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışma esnasında kullanılan/elde edilen materyale dışarıdan herhangi bir bulaşın önlenmesi veya en aza indirilmesi mümkün olabilir (1,7).

Bunların başında çalışma alanının “temiz alan” ve “kirlili alan” olarak ayrılması ve bunun için en az iki odanın belirlenmesi gelmektedir. IVAR reaktifleri ve örneklerin hazırlanması için bir oda (PRE-IVAR) belirlenmeli ve bu alanda POST-IVAR tüpleri veya DNA/RNA kesinlikle girmemelidir. Agaroz jel elektroforez ve görüntüleme gibi POST-IVAR işlemler için, PRE-IVAR odasından fiziksel olarak ayrılmış ikinci bir oda gereklidir. Mümkünse bu iki odada, *hava-kilidi* sistemi ile hava basıncının düzenlenmesi ve PRE-IVAR içerisinde PZR reaktifleri ve master mikslerin hazırlanması için bir *clean room* (temiz oda) dizayn edilmesi önerilmektedir. Temiz odada pozitif hava basıncı, POST-IVAR odada ise negatif hava basıncı sağlanması amplikonların kirlili alandan temiz alana bulaşını önlemede oldukça etkilidir (15-17).

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında, çapraz bulaşı önlemek için PRE ve POST-IVAR alanlarda kullanılan otomatik pipetler, pipet uçları, eldivenler, küçük masa üstü santrifüjleri, tüp sporları başta olmak üzere tüm cihaz ve ekipmanlar tamamen ayrılmalı, bunlar laboratuvarlar arasında taşınmamalıdır (7,15). Ayrıca mümkünse bu alanlarda çalışan laboratuvar personeli de ayrı olmalı, laboratuvarlar arası personel hareketliliği kısıtlanmalıdır. Eğer bu mümkün değilse, laboratuvar çalışanı bir alandan diğerine geçerken önlük ve eldiven gibi kişisel koruyucu donanımlarını değiştirmelidir. Farklı renklerdeki laboratuvar önlükleri bu amaçla kullanılabilir.

Bir diğer önemli konu da, örnek akış yönünün tek yönlü olmasıdır. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarına gelen örnekler işlenirken sırasıyla (i) DNA ekstraksiyon/izolasyonu, (ii) nükleik asit amplifikasyonu ve (iii) agaroz jel elektroforez ile görüntüleme işlemlerinin gerçekleştirileceği bir iş akışı oluşturulması ve buna uyulmasıdır. Temiz alanda PZR ve benzeri uygulamaların reaktifleri uygun miktarlarda alikotlanmış olarak bulundurulmalı, uzun süreli saklama sınırlandırılmalıdır. Nükleik asit amplifikasyonunun temel aşaması olan master miks hazırlama işlemi temiz odada, buraya kalıp DNA’nın eklenmesi ve amplifikasyon ve diğer tüm POST-IVAR işlemleri kirlili alanda yapılmalıdır. Amplifikasyon ürünleri sadece POST-IVAR alanda açılmalı, başka hiçbir yerde açılmamalıdır. Burada kullanılan agaroz veya akrilamid jelleri, hibridizasyon kağıdı, hibridizasyon çözeltileri, POST-IVAR tüpleri, tek kullanımlık pipetler ve yıkama çözeltileri gibi tüm reaktif ve malzemeler uygun şekilde dekontamine edildikten sonra atık konteynerlerine atılmalıdır (16).

Bunların dışında günlük rutin uygulamalarda, temizliğin sağlanması ve UV ile ortamın amplikonlardan arındırılması gibi konular bilhassa önem arz etmektedir. Moleküler laboratuvarlarında çapraz bulaşın önlenmesi konusunda pek çok çalışma mevcuttur (1-4). Ancak son zamanlardaki çalışmalarda, dezenfektanların etkinliği ve bu konuda kullanıma giren ticari kitler konusu ön plana çıkmıştır (18). Esasen dezenfektanların etkinliğinin

belirlenmesi için standardize edilmiş ulusal ve uluslararası rehberler bulunmaktadır (19, 20). Sodyum hipoklorit, moleküler laboratuvarları için kullanışlı bir dezenfektan olup, hazırlaması kolay ve ucuz olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır (21, 22). Diğer yandan, UV ışınının DNA üzerinde birbirine komşu iki pirimidin arasında kovalent bağ oluşumuna neden olduğu, bunun da çapraz amplikonları inaktive ettiği bilinmektedir (23-25). Bu nedenle, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında UV lamba kullanımı bir diğer önemli gereklilik olarak dikkati çekmektedir. Laboratuvarımız moleküler mikrobiyoloji laboratuvarları için yeterli alt yapı ve diğer gereklilikleri sağlamıştır. Bunun yanı sıra TS EN ISO 15189 standardına dayalı KYS kapsamındaki kalite ve akreditasyon çalışmalarında, bir talimat oluşturularak (ÇT03/MRLDB-06) ortam kontrolünün nasıl yapılacağı, çapraz bulaş ile karşılaşılması durumunda nasıl bir yol izleneceği ve daha önemlisi çapraz bulaş sorunu ile karşılaşmamak veya bu sorunu en aza indirmek için günlük rutin uygulamalarda temizliğin/dekontaminasyonun nasıl yapılacağı, UV lamba kullanımı gibi diğer işlemlere de detaylı bir şekilde yer verilmiştir.

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında, çapraz bulaşın tespit edilmesi konusunda kullanılabilir yöntemler ile ilgili güncel çalışmalar mevcuttur. Son zamanlarda, özellikle sekans bazlı 16S rRNA yönteminin bulaş tespitinde kullanışlı olabileceği konusu gündeme gelmiştir (26). Bu konudaki genel yaklaşımın bulaş ortaya çıktıktan sonra kaynağının araştırılması

şeklinde olduğu söylenebilir. Bu çalışmada ise bulaş sorunu ile karşılaşılması için ortamın kontrolü konusu ele alınmıştır. Laboratuvarımızda, ortam kontrolü için alınan örnekler, ilk başta içerisinde bulunan dönemde laboratuvarında çalışılmakta olan mikroorganizmalara özgü primerlerle ayrı ayrı test edilirken, sonraları ise 16S rRNA yönteminin daha kullanışlı olacağı düşüncesi hakim olmuştur. 16S rRNA yönteminde kullanılan primerler, mikroorganizmaların ortak gen bölgelerini hedef aldığı için ortamda bulaş varsa saptayabilecek, ardından yapılacak DNA dizi analizi işlemi ile de bulaşa neden olan organizmanın tanımlanması mümkün olabilecektir. 16S rRNA yöntemi oldukça yüksek duyarlılıkta olmasının yanı sıra iş ve zaman gücünden tasarruf sağlaması açısından laboratuvarımızda ortam kontrolü çalışmalarında kullanışlı bir yöntem olarak seçilmiştir.

Günümüzde, in vitro amplifikasyon reaksiyonu ürünlerinin kontrolü konusu giderek önem kazanmaktadır. Laboratuvar akreditasyon kuruluşları sertifikasyon için klinik laboratuvarlarda ortam kontrolünün sağlanmasını istemektedirler. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarları için GCLP uygulamaları ile ilgili pek çok kaynak bulunmaktadır. Ancak ortam kontrolünün nasıl yapılacağı konusunda özgün araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında ortam kontrolü ve laboratuvar güvenliği konularını ele alınırken ve bu konularda kendi ihtiyaçlarına yönelik talimatlar hazırlanırken yararlı olabileceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Mifflin TE. Control of contamination associated with PCR and other amplification reactions. Clin Chem News, 1992; 18: 8-15.
2. Lo YM, Mehal WZ, Fleming KA. False-positive results and the polymerase chain reaction. Lancet, 1988; 2(8612): 679.
3. Kitchin PA, Szotyori Z, Fromholz C, Almond N. Avoidance of PCR false positives. Nature, 1990; 344(6263): 201.
4. Hughes T, Janssen JW, Morgan G, Martiat P, Saglio G, Pignon JM, et al. False-positive results with PCR to detect leukaemia-specific transcript. Lancet, 1990; 335(8696): 1037-8.
5. Anonymous. İyi Laboratuvar Uygulamaları Prensipleri ve Test Laboratuvarlarının Belgelendirilmesine Dair Yönetmelik. <https://www.saglik.gov.tr/TR,10450/iyi-laboratuvar-uygulamaları-prensipleri-ve-test-laboratuvarlarının-belgelendirilmesine-dair-yonetmelik.html>, (Erişim Tarihi: 25.02.2018).

6. Anonymous. Good Clinical Laboratory Practice (GCLP). <http://www.who.int/tdr/publications/documents/gclp-web.pdf>, (Erişim Tarihi: 25.02.2018).
7. Viana RV, Wallis CL. Good clinical laboratory practice (GCLP) for molecular based tests used in diagnostic laboratories. In: Akyar I, ed. *Wide Spectra of Quality Control*. 1st ed. Rijeka, Croatia: Intech, 2011: 30-34.
8. Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17(19): 7843-53.
9. Amann RI, Krumholz L, Stahl DA. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol*, 1990; 172(2): 762-70.
10. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82(20): 6955-9.
11. Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med*, 1992; 327(5): 293-301.
12. Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990; 28(9): 1942-6.
13. Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Bacteriol*, 1991; 41(2): 324-5.
14. Maiwald M. Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In: Persing DH, Tenover FC, Tang YW, Nolte FS, Hayden RT, van Belkum A, eds. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles And Practice*. 2nd edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 2011: 491-505.
15. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989; 339(6221): 237-8.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
17. Kwok S. Procedures to minimize PCR product carryover. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 142-5.
18. Fischer M, Renevey N, Thür B, Hoffmann D, Beer M, Hoffmann B. Efficacy assessment of nucleic acid decontamination reagents used in molecular diagnostic laboratories. *PLoS One*, 2016; 11(7): e0159274.
19. van Klingeren B, Koller W, Bloomfield SF, Böhm R, Cremieux A, Holah J, et al. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. *Int Biodeter Biodegr*, 1998; 41(3-4): 289-96.
20. Reybrouck G. The testing of disinfectants. *Int Biodeter Biodegr*, 1998; 41(3-4): 269-72.
21. Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, De Groot S, Van Thuyne N, Haerinck S, Van Nieuwerburgh F, et al. Sources of DNA contamination and decontamination procedures in the forensic laboratory. *J Forensic Res*, 2011; (2): S2-001.
22. Prince AM, Andrus L. PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques*, 1992; 12(3): 358-60.
23. Ou CY, Moore JL, Schochetman G. Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 1991; 10(4): 442-5.
24. Niederhauser C, Höfelein C, Wegmüller B, Lüthy J, Candrian U. Reliability of PCR decontamination systems. *PCR Methods Appl*, 1994; 4(2): 117-23.
25. Pao CC, Hor JJ, Tsai PL, Horng MY. Inhibition of in vitro enzymatic DNA amplification reaction by ultraviolet light irradiation. *Mol Cell Probes*, 1993; 7(3): 217-9.
26. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol*, 2014; 12: 87.