

Mikrobiyal DNA tayini ile kolorektal anastomoz kaçaklarının erken tanısı

Early diagnosis of colorectal anastomotic leakages by detection of bacterial genome

Turgay EMET¹, Yılmaz BİLSEL¹, Metin TILKI¹, Ali SÜRMEİOĞLU¹, Yılmaz USER¹

AMAÇ

Mikrobiyal infeksiyonların ve intestinal bakteriyel translokasyonun çoklu organ yetmezliğine yol açan en önemli etkenler olduğu düşünülmektedir. Ancak bakteri kültürleri bu komplikasyonların bulunduğu hastalarda çoğunlukla negatif olarak sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda deneysel bir anastomoz kaçağı modeli oluşturup, denek kanında etken patojenin (*Escherichia coli*) DNA'sını PCR ile tespit ederek, bu işlemin anastomoz kaçaklarının önceden tanınmasını sağlayabilecek bir yöntem olup olamayacağını araştırmak istedik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu amaçla 40 sıçan, kontrol, anastomoz ve kaçak grubu olarak üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece laparotomi, anastomoz grubuna kolon rezeksiyonu ve anastomoz yapıldı. Kaçak grubunda ise kolon rezeksiyonu ve anastomoz yapılırken lümenin bir kısmı açık bırakıldı. İşlem öncesinde, işlemin üçüncü ve altıncı günlerinde deneklerden kan örnekleri alındı. Bu örneklerden DNA'lar elde edildi ve *Escherichia coli*'ye uygun primerlerle reaksiyona tabi tutularak bu patojenin varlığı araştırıldı. İstatistiksel analiz, Fisher'in kesin ki-kare testiyle her bir grupta kanlarında mikrobiyal DNA saptanan deneklerin karşılaştırılmasıyla yapıldı. Gruplar arasındaki fark *P* değeri 0.05'ten küçük olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kaçak grubundan üçüncü ve altıncı günlerde alınan kan örneklerinde diğer gruplara göre anlamlı derecede fazla oranda *Escherichia coli* DNA'sına rastlandı.

SONUÇ

PCR'in bakteriyemiyi kolaylıkla saptayabildiği, bu özelliğiyle de anastomoz kaçaklarının daha önce farkedilmesini sağlayacak bir yöntem olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Polimeraz zincir reaksiyonu, bakteriyemi, bakteriyel genom, anastomoz kaçağı

BACKGROUND

Microbial infections and translocation of intestinal bacteria are thought to contribute to multiple system organ failure, but bacterial cultures are often negative in patients with this complication. The purpose of this study was to determine the sensitivity of PCR for detecting microbial DNA in the blood of animals after conducting an experimental model of anastomotic leakage.

METHODS

Fourty rats were divided into three groups as follows: Control Group; simple laparotomy group, Anastomosis Group; colon resection and anastomosis group, and Leakage Group; group with colon resection and an anastomosis leaving a 5 mm opening. Blood was drawn from rats before the procedure, and postoperative 3rd and 6th days. DNAs were extracted from these samples and PCR techniques were used to amplify genes of *Escherichia coli*. Statistical analysis for the percentage of rats with microbial DNA in the blood for all groups was done by Fisher's exact chi-square test. The difference among groups was considered significant if the *P* value was less than 0.05.

RESULTS

Most of the detected *Escherichia coli* genes were from the Leakage Group, and the detection rate was significant compared to other groups.

CONCLUSION

We suggest that PCR could be a useful adjunct tool for immediate diagnosis of anastomotic leakages.

Key words: Polymerase chain reaction, bacteriemia, bacterial genome, anastomotic leakage

¹Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi
3. Genel Cerrahi Kliniği

¹Haydarpaşa Numune Research and Training Hospital
3. Clinics of Surgery

Kolorektal cerrahide en önemli ve korkulan komplikasyonlardan biri anastomoz ayrışması ve ona bağlı pelvipéritoneal sepsistir.^[1,2] Anastomoz kaçakları karşımıza klinik veya subklinik olarak çıkabilirler. Subklinik kaçaklar klinik kaçaklara göre daha yüksek oranda görülmelerine rağmen erken tanı her zaman mümkün olmaz.^[3-5] Distal kolon rezeksiyonu ve kolorektal anastomozlardan sonra hastanın yaşamını tehlikeye sokacak boyuttaki kaçak oranı % 3-15 arasındadır.^[11-6] Mortalite oranını kaçağın erken tanınması ve yandaş hastalıklar belirler. Kolorektal cerrahide mortalitenin %30-50'sinden anastomoz kaçakları sorumludur.

Anastomoz kaçağı tanısı klinik ya da radyolojik yöntemlerle konulabilir. Periton irritasyonu veya sepsis bulgusu olmayan stabil hastalar uygun antibiyotiklerle ve destek tedavilerle takip edilebilirler. Batın içinde koleksiyon gelişen hastalara ikinci bir cerrahi işlem gerekebileceği gibi tek başına perkütan drenaj da yeterli olabilir.^[11,6] Ancak anastomoz kaçağı tanısını koymak her zaman kolay olmamaktadır. Minimal bir kaçağın standart radyolojik yöntemlerle görüntülenememesi ve bazen klinik belirti ve bulguların son derece sessiz seyretmesi, hastanın bir anda sepsise girmesine yol açabilir.^[6, 7]

Bu sebeple, klinik olarak henüz kaçak şüphesinin olmadığı durumlarda cerrahları önceden uyuracak bir yönetime gereksinim vardır. Deneysel peritonit modellerinde bakteriyeminin çok çabuk oluştuğu bilinmektedir. Anaerobik bakteriyeminin kan kültürleri ile 1-6 saat içinde, aerobik bakteriyeminin ise 3-24 saat içinde tespit edilebildiği gösterilmiştir.^[8] Kolorektal anastomoz kaçaklarında oluşabilecek bakteriyeminin hızlı teşhisi ile alınabilecek önlemler sayesinde mortalite ve morbidite azaltılabilir. Ancak bir çok mikrobiyal patojenin kültürü için en az 2-5 gün gereklidir.^[9] Kültür sonuçları beklenirken başlanılan ampirik antibiyotik tedavisi ise gerek maliyeti artırması, gerekse başka dirençli mikrobiyal patojenlerin ortaya çıkmasına yol açtığından ayrı bir dezavantajdır.^[10] Günümüzde, infektif organizmanın varlığını belirlemek için nükleik asitlerin tespitine dayalı teknikler önemli oranda artmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction; PCR) tekniği ile kolorektal floraya ait mikrobiyal DNA'nın hasta kanında tayini bu konuya bir çözüm olabilir.

Bu düşüncelerle; deneysel bir anastomoz kaçağı modeli oluşturularak, deneğin kan örneğinden

kolon florasına ait mikroorganizmaların DNA'sını PCR ile tespit etmeye çalışarak, bu işlemin anastomoz kaçaklarının erken tanınmasını sağlayabilecek bir yöntem olup olmadığını araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Tıp ve Araştırma Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi (DETAM) Genetik Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneylere başlamadan önce Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanı Etik Kurulu'nun onayı (28.02.2003 tarih ve 09.2003.Mar sayılı karar) alındı.

Çalışmada 200-275 gr ağırlığındaki 40 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Deney öncesi üç haftalık sürede sıçanlar laboratuvar koşullarına alıştırdılar (22°C ± 2°C, 12 saat aydınlık/ karanlık). Standart yem ve su ile beslendiler.

Denekler 3 gruba ayrıldı: Grup I (Kontrol grubu, n: 10), Grup II (Anastomoz grubu, n:15), Grup III (Kaçak grubu, n:15). Anestezi intraperitoneal olarak uygulanan 100 mg/kg ketamin HCl (Ketalar, flakon, Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul-Türkiye) ve 0.75 mg/kg klorpromazin (Largactil, ampul, Rhone-Poulenc, Eczacıbaşı, İstanbul-Türkiye) enjeksiyonu ile sağlandı.

İlk gün tüm deneklerden kan örnekleri alındı. Kontaminasyona yol açmaksızın yeterli miktarlarda kan almak zor olduğundan, kan alma işlemi yapılırken her seferinde farklı bir bölge kullanıldı. İlk kan örneği için sağ femoral ven kullanıldı. İşlem öncesi kan alınacak bölge polivinilpirolidon iyot (Batticone®, Adeka, Türkiye) ile iyice silindikten sonra tıraş edildi. İkinci defa silme işlemi yapıldıktan sonra femoral kesileyle loja girilerek femoral vene ulaşıldı. Kan, 24G anjiyoket yardımıyla steril bir şekilde içinde antikoagulan olarak 2-5 µl Na2EDTA bulunan 2 ml'lik Eppendorf tüplerine alındı. Femoral bölge yine aseptik şartlar altında kapatıldı. Tüm kan örnekleri DNA ayrıştırma işlemi yapılana kadar +4°C'de saklandı. Daha sonra deneklere karın traşi yapıp polivinilpirolidon iyot ile iyice silindikten sonra ortahat laparotomisi uygulandı. Birinci gruba sadece laparotomi yapıldı. Batın açılıp hiçbir işlem yapılmaksızın tekrar kapatıldı (Kontrol grubu). İkinci gruptaki deneklere ise

laparotomi yapıldıktan sonra sol kolon distalinden rezektore edilerek yine aynı seviyeden 6/0 Vicryl® suture (Ethicon, Germany) ile tek kat üzerinden devamlı dikiş tekniği ile anastomoz yapıldı (Anastomoz grubu). Üçüncü gruba da, grup II'de olduğu gibi rezeksiyon ve anastomoz uygulandı. Ancak anastomozun antimezenterik tarafında yaklaşık 5 mm'lik bir açıklık bırakılarak anastomoz kaçak modeli oluşturuldu (Kaçak grubu).

Deneklerden 3. ve 6. günlerde tekrar kan örnekleri alındı. İkinci örnekleme için sol femoral ven kullanıldı. En son kan örneği ise intrakardiyak ponksiyonla, denekler sakrifiye edilecek şekilde alındı.

PCR İŞLEMİ

Tam kan örnekleri (1 ml) yeni steril tüplere aktarıldı ve kırmızı küreler lize ugratıldı. DNA izolasyon kitindeki (Roche) üretici firmanın ayrıntılı protokolü uyarınca DNA'lar ayrıştırıldı. Elde edilen DNA'lar daha sonraki işlemler için -20°C'de saklandı. DNA miktarı tüm vakalarda spektrofotometre (Beckman Instruments) ile ölçüldü.

Çalışmada, *Escherichia coli*'nin uidA geninden elde edilen, b-glukuronidaz'a özgü 2 çift oligonukleotid primer kullanıldı. Oligonukleotidler P1 (5'-ATC ACC GTG GTG ACG CAT GTC GC-3') ve P2 (5'-CAC CAC GAT GCC ATG TTC ATC TGC-3') PCR'in ilk döngüsünde 486-bp fragmanını amplifiye etmek için kullanıldılar. Polimeraz zincir reaksiyonu Tablo 1'deki gibi hazırlandı. Termodöngü cihazında (Perkin Elmer Cetus); 94 °C'de 5 dakika denatürasyon sonrasında; 25 döngü boyunca: 94°C'de 2 dakika denatürasyon, 65°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 2 dakika primer uzaması, 72°C'de 5 dakika süresince sonlanma tepkimesi için beklendi. Program bitiminde ürünler cihazdan alındı. On µl amplifikasyon ürünü 2 ml bromfenol mavisi ile karıştırıldı ve etidyum bromür çözeltisi eklenmiş olan jelde 1 saat 15 dakika boyunca tutuldu. Elektroforez işlemi sonucunda jel transilüminatör üzerine alınarak UV ışığı altında (304 nm) bilgisayarlı kamera yardımı ile görüntüldü ve fotoğrafı çekildi. Amplifiye edilen DNA'nın ağırlığı kontrol DNA'lar ve molekül ağırlığı standartı (DNA belirteci olarak Øx174 DNA/ BsuRI [HaeIII] belirteç 9 kullanıldı) ile karşılaştırılarak değerlendirildi (pozitif kontroller 'Minne-

apolis Medical Center'dan liyofilize halde gelmiş 20ml TE tamponunda çözüldü. Negatif DNA için ise kalıp içermeyen DNA kullanıldı.).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme SPSS for Windows v.10.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. Bağımsız grup oranlarının karşılaştırılması için Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı. P<0.05 olan farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi.

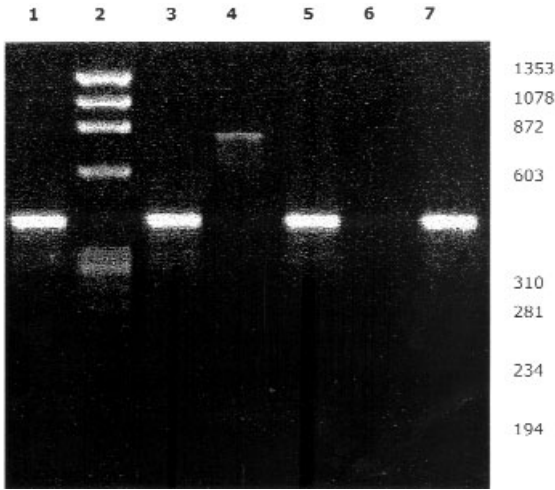
BULGULAR

Çalışmamıza 40 denek dahil edildi. İşlemler esnasında kaybedilen denek olmadı. Anastomoz kaçak oluşturulan deneklere laparotomi yapıldığında, kaçakların hemen hemen tamamının omentumla sarıldığı ve sınırlandığı görüldü. Anastomoz grubundaki iki denekte de benzer bulgular saptandığı için, bu deneklerde de minimal bir kaçak olduğu düşünüldü. Üç kan örneğinden, işlemler birkaç kez tekrarlanmasına rağmen, izole edilen DNA miktarı yeterli olmadığı için (yeterli optik dansite sağlanamadı) çalışma yapılamadı. Bu sebeple çalışılan toplam kan sayısı 117 oldu.

İlk gün alınan kan örneklerinde *Escherichia coli* DNA'sına hiçbir grupta rastlanmadı. Kontrol grubunun 3. ve 6. gün alınan kan örneklerinde de DNA bandı izlenmedi. Grup II ve III'ün, 3. ve 6. günkü kan örneklerinde toplam 25 vakada PCR (+) olarak değerlendirildi (Tablo 2).

Anastomoz grubunda üçüncü gün alınan kan örneklerinin 2'si, altıncı gün alınan kan örneklerinin ise 4'ü (+) olarak saptandı. Kaçak grubunda ise üçüncü gün deneklerin 8'inde, altıncı gün ise 11'inde *Escherichia coli* bandı görüldü (Şekil 1). Anastomoz ve kaçak gruplarını PCR pozitifliği açısından karşılaştırdığımızda hem üçüncü gün sonuçları (P=0.05), hem de altıncı gün sonuçları (P=0.02) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı.

Anastomoz grubunu, kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda, üçüncü ve altıncı günler arasındaki PCR pozitifliğinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (sırasıyla, P=0.4 ve P=0.06). Kontrol grubunu kaçak grubuyla karşılaştırdığımız zaman ise hem üçüncü (P=0.04), hem de altıncı gün sonuçları (P=0.001) arasında anlamlı bir fark bulundu.



Resim 1. Denek kanlarından izole edilen *E. Koli*'lerin PCR tepkimesi ile elde edilen amplifikasyon ürün bantlarının jel elektrofarezdeki görünümü. [Sütun 1,3,5 ve 7'deki bantlar pozitif bantları (486 bp), sütun 2 belirteci (Φ x 174 Hae III), sütun 4 pozitif kontrolü ve sütun 6 negatif kontrolü göstermektedir.]

TARTIŞMA

Anastomoz kaçakları gastrointestinal cerrahide en korkulan komplikasyonlardan biridir. Anastomoz komplikasyonları hastanede kalış süresini uzattıkları gibi ameliyat sonrası mortaliteyi de 6 kat arttırmaktadır.^[11] Literatürdeki anastomoz kaçığı oranları % 1-20 arasında değişmektedir.^[4, 11, 12] Oranlar arasındaki bu geniş fark anastomoz seviyesinden, kullanılan cerrahi yöntemden ve cerrahın tecrübesinden kaynaklanmaktadır. İntraperitoneal anastomozların kaçık oranı % 1-3 arasındayken, ekstraperitoneal anastomozlarda, örneğin aşağı anterior rezeksiyon veya koloanal anastomozlarda kaçık oranı % 20'lere ulaşmaktadır.^[11]

Anastomoz kaçaklarının erken bulgu ve belirtileri ateş, uzamış ileus, lökositöz ve taşikardidir. Hastanın ameliyat sonrası durumu beklendiği gibi geçmiyorsa, anastomoz kaçığı mutlaka akla gelmelidir. Kaçık sıklıkla ameliyat sonrası 5-7. günler arasında kendini belli eder. Erken dönemde karın içi yapışıklık olmadığı için enfeksiyon sınırlanmadığından bu dönemde gelişen kaçıkların morbiditesi ve mortalitesi daha yüksektir. Bir çok kez hastada yaygın peritonit hali görülmez. Bunun yerine

ileus, ateş, taşikardi gibi bir türlü düzelmeyen inflamatuvar yanıt bulguları vardır. Anastomoz kaçığı şüphesi gündeme geldiğinde, hasta çabuk ve doğru bir şekilde değerlendirilmeli ve bir an önce uygun tedaviye başlanmalıdır. Yakın takibe ve ileri teknolojiye rağmen bazı subklinik kaçakları tanımakta halen güçlük çekilmektedir. Bu kaçıkların çoğu kendilerini sınırlar. Ancak yandaş hastalığı olan, yaşlı veya düşkün bazı hastalarda farkedilmeyen bu durum bir anda sepsis tablosu haline dönüşebildiğinden oldukça önemlidir.

Çalışmamızda, sessiz seyreden çoğu zaman tanının dahi konulamadığı bu tür subklinik kaçıklarda erken tanının PCR yöntemiyle konulup konulamayacağını göstermeye çalıştık. Hayvan modelimizi insandaki distal anastomoz kaçığına benzer bir şekilde oluşturduk. Bu yüzden bilinen sepsis modellerini kullanmak yerine, deneklerin sol kolonlarının en distaline, rezeksiyonu takiben anastomoz yaptık veya kaçık oluşturduk. Sepsisin polimikrobiyal karakteri de düşünülerek, belli bir ajan inoküle edilmeksizin canlının kendi kolon florası ile peritoneal kontaminasyon sağlandı. Bu şekilde, bir sepsis modelinden çok bakteriyemi veya sınırlı bir peritonit modeliyle çalışmış olduk. Çünkü amacımız ilk etapta sepsis oluşturmak yerine, batın içi kontaminasyon veya peritonit oluştuğunda onu mevcut konvansiyonel tanı yöntemlerinden daha erken teşhis edebilecek bir yöntem geliştirmekti. Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda, özellikle kaçık grubundaki deneklerde anlamlı miktarda *Escherichia coli* genomuna rastlanması bu yöntemin uygun bir kaçık modeli olduğunu göstermektedir.

Bakteriyemik hastalarda kullanılan antibiyotik, enfeksiyon kaynağı, şok, altta yatan hastalıklar, organ yetmezliği gibi birçok neden bağımsız olarak mortaliteyi arttırmakta olduğundan ağır veya durumu bozulmakta olan hastalarda kandaki bakteriyi izole etmek oldukça önemlidir. Bakterinin izolasyonu uygun antibiyoterapinin başlamasına olanak sağlayacağından hayat kurtarıcı olabilir.

Kan kültürünün kandaki mikroorganizmaları tespit edebilen en hassas yöntem olduğu kabul edilmektedir.^[12-14] Ancak bir çok klinisyen ve mikrobiyolog, antibiyoterapi alan hastalarda, bakteriyeminin tam olarak tespit edilemediğini düşünmektedir. Klinik olarak sepsis düşünülen hastaların bir çoğunda da kan kültürleri negatiftir.^[13] Bu

durum iki şekilde açıklanabilir; Hastalar bakteriyemik olmalarına rağmen bazı sebeplerden dolayı organizma kültür ortamında çoğalamamaktadır. Hastanın kan kültürü alındığı esnada antibiyotik kullanması, alınan kan örneğinin yetersiz olması, kültür ortamında bazı bakteriyostatik faktörlerin varlığı, kimi hassas mikroorganizmaların kültür ortamında canlılıklarını yitirmesi gibi sebeplerle bakteriyemi tanısı doğrulanamayabilir. Bir diğer açıklama ise, görünüm olarak septik olan bir hastanın kan örneği alımı esnasında bakteriyemik olmaması ve genel durumunun pirojenik sitokin aktivitesine bağlı olmasıdır. Bu olasılıkları ayırt etmek günümüzde henüz mümkün değildir.^[14,15] Bakteriyemide erken ve uygun antibiyotik kullanımı hasta için yaşamsal değerdedir olduğundan kandaki bakterinin çabuk ve güvenilir bir şekilde tanımlanması klinik önem taşımaktadır.

Anastomoz kaçağı ve buna bağlı karın içi sepsis düşünülen hastalarda kan kültürleri yeterince yol gösterici olmayabilir, ya da kültürün sonuçlanması gecikebilir. Doğru tedavi için doğru tanı gerektiğinden bu gibi durumlarda alternatif yöntemler gündeme gelmektedir. PCR ve diğer dizin bazı mikrobiyal tanı yöntemleri bir zamanlar sadece araştırmalar için kullanılırken, günümüzde giderek artan daha yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Bakteriyemi teşhisi için PCR ile kan analizi yapılmasının, konvansiyonel immunolojik tekniklere ve gram boyamaya göre daha hızlı ve daha duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir.^[9]

Mikrobiyal DNA'nın varlığını tespit eden birçok PCR tekniği tarif edilmiştir.^[8] *Escherichia coli* inkülasyonuyla bakteriyemi oluşturulan antibiyoterapi altındaki sıçanlarda, PCR ile kan kültürüne göre daha yüksek oranda *Escherichia coli* saptanabilmiştir.^[16] Reno ve ark.'nın^[10] 87 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, PCR'in bakteriyemi tespit etmede klasik yöntemlere göre daha hızlı ve duyarlı olduğu görülmüştür. Yoğun bakım hastalarında yapılan bir başka çalışmada, PCR'in bakteriyemi tespit etmede kan kültürlerine göre daha üstün olduğu saptanmıştır.^[14] Sepsis etiolojisinde bakteriyel translokasyon da suçlandığından, bu konu üzerinde de benzer çalışmalar yapılmıştır. Bakteriyel translokasyon modellerinde PCR'in mikrobiyal DNA tayininde oldukça özgül ve duyarlı olduğu tespit edilmiştir.^[16] Yine Kane ve ark.'nın^[9] bir çalışmasında, OKT3 tedavisi alan 8

nakil hastasının kanında mikrobiyal DNA'ya rastlanması bakteriyel translokasyon ile izah edilmiştir. Kültür veya southern hibridizasyon yöntemleriyle 2-3 günde sonuç alınabilen su tahlilleri, PCR yöntemiyle 6-8 saat içerisinde sonuçlanmaktadır.^[18] Bu protokol 50 ml su içindeki 1-10 bakteri (*Escherichia coli*) hücrelerini tespit edebilecek kadar hassastır.

Deneyisel çalışmalar sekonder peritonitin iki fazlı bir enfeksiyon olduğunu ortaya koymaktadır. Birinci faz *Escherichia coli* gibi endotoksin üreten akut peritonit ya da septik/toksik fazla karakterizedir. İkinci ya da kronik apse fazı ise genellikle *Bacteroides fragilis* gibi zorunlu anaerobların etkisi ile ortaya çıkar. Peritonitin mikrobiyolojisi ilk fazlarda enfeksiyonun tipi ve kaynağı ile ciddi olarak değişiklik gösterir. Sekonder peritonit polimikrobiyal bir enfeksiyon olup, özellikle *Escherichia coli* ve *Bacteroides fragilis* gibi intestinal mikroorganizmalar izole edilir.^[8] Bu sebeple çalışmamızda sadece *Escherichia coli* genomunu tespit etmekle yetindik.

Sonuçlarımıza baktığımızda, kaçak grubundaki *Escherichia coli* pozitiflik oranı hem kontrol, hem de anastomoz grubuna göre anlamlı olarak fazlaydı. Deneklerdeki kaçakların omentumla sınırlandırılmış ve hiçbir denegın de ölmediğini göz önüne alırsak, bu kaçakların minimal olduğunu, PCR'ın bunları tespit etmede oldukça etkin olduğunu söyleyebiliriz. Anastomoz grubunda üçüncü günde 2, altıncı günde 4 denekte PCR pozitif olarak değerlendirildi. Bu deneklerin ikisinde minimal bir kaçak geliştiği düşünüldü ve gerçekten laparotomilerinde her iki denegın anastomozlarının omentumla sarılmış olduğu görüldü. Diğer ikisinde ise böyle bir durumla karşılaşmadığından, bu deneklerde ya çok minimal bir kaçak geliştiği ya da ameliyat esnasında kontaminasyon gelişmiş olabileceği varsayıldı.

PCR bakteriyel DNA'yı tespit etmede oldukça başarılı bir yöntemdir. Bu yöntemle DNA kalıbının 100 fg'lık bir kesiti bile tayin edilebilir. Bu da sadece 10 mikroorganizma demektir. Başka bir deyişle duyarlılığı çok yüksek olmasına rağmen düşük özgüllüğü bir dezavantaj olabilir. Bu yöntemle ölü mikroorganizmaların bile DNA'sı tespit edilebilir. DNA daha evvelden rezorbe edilmiş ölü bir mikroorganizmaya ya da fagositler tarafından yakalanmış ve yok edilmiş bir organizmaya da ait olabilir.^[19] Teorik olarak mümkün olan bu durumun klinik önemi henüz bilinmemektedir. PCR'ın başka dezavan-

tajları da vardır. İşlem esnasında farkedilmeyen en ufak bir kontaminasyon yanlış pozitif reaksiyon verebilir.^[20] Yanlış negatiflik de mümkündür. Bir örnekte patojen mevcut olmasına rağmen tespit edilemediyse bir inhibisyon söz konusudur. İnhibisyonun nedenleri arasında spesifik olmayan DNA inhibitörlerinin yanı sıra, Taq DNA polimeraz enzimini inhibe edici ajanların varlığı da düşünülmektedir.^[20]
²¹⁾ Bu yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar zaman içerisinde gelişen teknolojiyle, özgün primerler ve problemler kullanılarak çözümlenebilir.

SONUÇ

PCR rutin uygulaması henüz olmayan bir yöntem olmasına rağmen mikrobiyal DNA'yı kolay, çabuk ve ucuz bir şekilde tespit edebilmektedir. Bu özelliği nedeniyle anastomoz kaçağı düşünülen ya da kaçak ihtimali yüksek olan hastalarda bakteriyeminin erken tanınması amacıyla PCR kullanılabilir.

Teşekkür

Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi Genetik Anabilim Dalı'nda görevli Sn. Neşe Kiremit Korkut'a çalışmamıza sağladığı katkılar ve sarfettiği emek için en içten teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Nivatvongs S. Complications of Anorectal and Colorectal Operations. In: Gordon PH, Nivatvongs S, editors. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum, and Anus. 2th ed. St.Louis: Quality Medical Pub Inc; 1999. p.1302-1316.
2. Pollard VW, Nivatvongs S, Rojanasakul A, Ilstrup DM. Carcinoma of the rectum profiles of intraoperative and early postoperative complications. Dis Colon Rectum 1994; 37: 866-874.
3. Karanjia ND, Corder AP, Bearn P, Heald RJ. Leakage from stapled low anastomosis after total mesorectal excision for carcinoma of the rectum. Br J Surg 1994; 81:1224-1226.
4. Bokey EL, Chapius PH, Fung C, Hughes WJ, Koorey SG, Brewer D, et al. Postoperative morbidity and mortality following resection of the colon and rectum for cancer. Dis Colon Rectum 1995; 38:480-487.
5. Irvin TT, Goligher JC. Aetiology of disruption of anastomoses. Br J Surg 1973; 60: 461-462.
6. Kodner I. Rectal Cancer. In: Zinner MJ, Schwartz SI, Ellis H, editors. Maingot's Abdominal Operations. 10th ed. London: Prentice Hall Limited; 1997. p. 491-1492.
7. Kodner IJ, Robert DF, James W, Thomas ER. Colon, Rectum and Anus. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, editors. Principles of Surgery. 7th ed. New York: Mc Graw-Hill; 1999. p.1359-1360.
8. Shrotri M, Peyton JC, Cheadle WG. Mouse peritonitis model using cecal ligation and puncture. In: Zac O. Sande MA, editors. Handbook of Animal Models of Infection. Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy, 3th ed. California/USA; Academic Press: 1999. p.173-181.
9. Kane TD, Alexander JW, Jhannigan A. The detection of microbial DNA in the blood. Ann Surg 1998; 1; 1-9.
10. Reno WL 3rd, McDaniel DO, Turner WW Jr, Williams MD. Polymerase chain reaction for the detection of bacteremia. Am Surg 2001; 67: 508-512.
11. Golub R, Cantu R, Stein HD. A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomosis. J Am Coll Surg 1997; 184: 364-372.
12. Vignali A, Fazio V, Lavery IC. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: A review of 1014 patients. J Am Coll Surg 1997; 183: 105-113.
13. Bone RC. Epidemiology and natural history of SIRS. JAMA 1992; 269: 3452-3455.
14. Cursons RT, Jeyerajah E, Sleigh JW. The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. Crit Care Med 1999; 27: 937-940.
15. Wilson ML. Blood cultures. Editorial. Clin Lab Med 1994; 14; 102.
16. Heininger A, Binder M, Schmidt S. PCR and blood culture for detection of E. coli bacteremia in rats. J Clin Microbiol 1999; 37: 2479-2482.
17. Kane TD, Jhonson SR, Alexander JW. Detection of intestinal bacterial translocation using PCR. J Surg Res 1996; 63: 59-63.
18. Juck D, Ingram J, Prevost M, Coallier J, Greer C. Nested PCR protocol for the rapid detection of Escherichia coli in potable water. Can J Microbiol 1996; 42: 862-866.
19. Wilmore DW. Polymerase chain reaction surveillance of microbial DNA in critically ill patients: Exploring another new frontier. Ann Surg 1998; 1: 10-11.
20. Fredricks DN, Rellman AD. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. Clin Infect Dis 1999; 29: 475-488.
21. Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, Cadranell J, Lessossier D, van Embden J, et al. Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. J Clin Microbiol 1996; 34: 1209-1215.

