Cilt / *Volume* 46
Sayı / *Number* 3
Eylül / *September* 2016

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✔ Ülkemizde Yoğun Bakım Ünitelerinde Antimikrobiyal Direnç Sorunu
- ✔ Farklı Çevre Koşullarında Klink *Salmonella* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Araştırılması
- ✔ Lamivudin Tedavisi Alan Kronik Hepatit B Hastalarında Direnç Mutasyonlarının Moleküler Yöntem ile Belirlenmesi
- ✔ Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Rektal Sürüntü Örneklerinden Saptanmasında BD MAX™ CRE Yönteminin Etkinliği

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 46

Sayı / *Number* 3

Eylül / *September* 2016

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 46 Sayı / *Number* 3 Eylül / *September* 2016

Editör / *Editor in Chief*

Çağrı Ergin
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

Bölüm Editörleri / *Section Editors*

Sebahat Aksaray; Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Nilay Çöplü; Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Ayşe Esra Karakoç; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Ebru Evren; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bedia Dinç; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Ramazan Gümral; Van Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Funda Doğruman-Al; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar Kurulu / *Advisory Board*

Halis Akalın (Uludağ Üniversitesi)
Osman Aktaş (Atatürk Üniversitesi)
Sibel Aydoğan (Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi)
Feriha Çilli (Ege Üniversitesi)
Hande Dağcı (Ege Üniversitesi)
İştar Dolapçı (Ankara Üniversitesi)
Sevgi Ergin (İstanbul Üniversitesi)
Hüseyin Güdücüoğlu (Yüzüncü Yıl Üniversitesi)
Deniz Gür (Hacettepe Üniversitesi)
Şaban Gürcan (Trakya Üniversitesi)
Ayşe Gürsoy (Ankara Üniversitesi)
Gülşen Hasçelik (Hacettepe Üniversitesi)
Ceren Karahan (Ankara Üniversitesi)
Aynur Karadenizli (Kocaeli Üniversitesi)
Çiğdem Kayacan (İstanbul Üniversitesi)
Cüneyt Özakın (Uludağ Üniversitesi)
Ayşegül Özkan (Hitit Üniversitesi)
Ömer Şimşek (Pamukkale Üniversitesi)
Meltem Işıkgöz Taşbakan (Ege Üniversitesi)

Yayımlanan sayıya ait değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

"Türkiye Atıf Dizini" tarafından indekslenmektedir.

Sahibi / *Owner*

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Adına
On Behalf of The Turkish Society of Microbiology

Prof. Dr. Zeynep Çiğdem Kayacan

Yazışma Adresi / *Correspondence Adres*

Prof. Dr. Çağrı Ergin
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası
Kınıklı / Denizli
Tel: 0258 296 24 91
e-posta: tmcdeditor@gmail.com
www.tmc-online.org

Mart, Haziran, Eylül, Aralık olmak üzere yılda 4 kez yayınlanır.

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Her Hakkı Mahfuzdur.
Turkish Society of Microbiology, All Rights Reserved

Copyright © 1993

Yayın Türü: Yerel Süreli

Basım Yeri / *Printed by*

Logos Yayıncılık Tic. A.Ş.
Yıldız Posta Cad. Sinan Ap. No. 36 K.12 D.66-67
34349 Gayrettepe-İstanbul
Tel: 0212 288 50 22 - 288 05 41 **Faks:** 0212 211 61 85
e-posta: logos@logos.com.tr www.logos.com.tr

Bu dergi **Acid Free (Alkali)** kağıda basılmaktadır. / *This journal is printed on* ***Acid-Free paper***

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 46 Sayı / *Number* 3 Eylül / *September* 2016

İÇİNDEKİLER / *CONTENTS*

DERLEME / *REVIEW*

- **Ülkemizde Yoğun Bakım Ünitelerinde Antimikrobiyal Direnç Sorunu**

  The Problem of Antimicrobial Resistance in Intensive Care Units in Turkey

  Pınar ÇIRALIGİL **97-101**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / *CLINICAL INVESTIGATIONS*

- **Farklı Çevre Koşullarında Klinik *Salmonella* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Araştırılması**

  Investigation of Biofilm Forming Capacity of Clinical Salmonella Isolatesunder Different Environmental Conditions

  Zaliha BALTACIOĞLU, Fethiye Ferda YILMAZ, Mine HOŞGÖR LİMONCU, Şöhret AYDEMİR, Alper TUNGER **105-111**

- **Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Rektal Sürüntü Örneklerinden Saptanmasında BD MAX™ CRE Yönteminin Etkinliği**

  Efficiency of BD MAX™ CRE Method on Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriacee spp. from Rectal Swab Samples

  Ayşe Nur SARI, Sema ALP ÇAVUŞ, Zeynep GÜLAY **112-121**

- **Antalya Yöresinde Bazı Otel Yemeklerinde *Staphylococcus aureus* Enterotoksini Araştırılması**

  Investigation of Staphylococcus aureus Enterotoxins in the Hotel Food in Antalya, Turkey

  İbrahim YILDIRIM, Rasih FELEK **122-127**

- **Antibiyotik Kontrol Ekibi Bakış Açısı ile Cerrahi Yara Enfeksiyonlarına Yaklaşım**
  Approach to Surgical Wound Infections from the Perspective of Antibiotic Control Team
  Nilay ÇÖPLÜ, Mustafa ÇAĞATAY, Nesibe AYGÜN ÜNAL, Şeyma SİNGER,
  Duygu ÖCAL **128-134**

- **Lamividun Tedavisi Alan Kronik Hepatit B Hastalarında Direnç Mutasyonlarının Moleküler Yöntem ile Belirlenmesi**
  Detection of Resistance Mutations Using Molecular Method in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Lamivudine Therapy
  Sevin KIRDAR, Mehmet Hadi YAŞA, Nerian AYDIN,
  Berna GÜLTEKİN KORKMAZGİL **135-140**

OLGU SUNUMU / *CASE REPORT*

- **Liberya Kökenli *Plasmodium falciparum*'un Etken Olduğu İmporte Bir Sıtma Olgusu**
  Plasmodium falciparum Malaria Imported from Liberia
  Yüksel AKKAYA, Mustafa ŞENGÜL, Zeynep UZUN, Zühre ALPUA, Emin Oğuzhan OĞUZ,
  Seher TOPLUOĞLU, Ebru AYDIN **141-145**

YAZARLARA BİLGİ ..... **V-VI**

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(3):97-101, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.097

Derleme

Ülkemizde Yoğun Bakım Ünitelerinde Antimikrobiyal Direnç Sorunu[§]

Pınar ÇIRALIGİL
Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Yoğun bakım üniteleri (YBÜ) multidisipliner hizmet veren ve hastane yatak kapasitelerine oranla enfeksiyonlarının en sık görüldüğü bölümleridir.

Özellikle çoklu ilaca dirençli enfeksiyonlar ve yoğun antibiyotik kullanımı ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Metisiline dirençli Staphylococcus aureus, vankomisine dirençli enterokoklar, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz ve karbapenemaz üreten Escherichia coli, Klebsiella türleri ve diğer Enterobacteriaceae ailesi üyeleri, Acinetobacter türleri ve Pseudomonas aeruginosa YBÜ'lerinde hastane enfeksiyonlarından (Hİ) sıklıkla sorumlu tutulan dirençli mikroorganizmalardır. Hastalara uygulanan invaziv girişimler, hastalığın şiddeti, yetersiz enfeksiyon kontrolü gibi faktörler enfeksiyon artışına neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra üçüncü kuşak sefalosporinler, anti-pseudomonal penisilinler, karbapenemler, florokinolonlar gibi geniş spektrumlu parenteral antibiyotik kullanımı da hastane enfeksiyonu gelişiminde rol oynamaktadır. Antibiyotiklere dirençli etkenlerin neden olduğu enfeksiyonlar yalnızca morbidite ve mortaliteyi artırmakla kalmayıp, hastanede yatış süresinde uzama, maliyet ve değişik ciddi medikal komplikasyonlarda artışla sonlanmaktadır.

Hastanelerde ve özellikle YBÜ'lerinde sürekli gözetim gerektiren Hİ'na yönelik önlemler alınması ve ampirik veya kanıta dayalı etkin antimikrobiyal tedavinin yapılabilmesi için, YBÜ'lerinde sıklıkla saptanan etkenlerin ve antibiyotik duyarlılıklarının izlenerek tedavi protokollerinin bu doğrultuda güncellenmesi gereklidir. Dolayısıyla yapılacak sürveyans çalışmaları ile gerçek sorunlar saptanıp, kümülatif antibiyogram sonuçları ile desteklenerek hedefe yönelik tedavi uygulanabilir ve YBÜ'lerinde yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar kontrol altına alınabilir.

Anahtar kelimeler: *Antibiyotik direnci, yoğun bakım ünitesi*

SUMMARY

The Problem of Antimicrobial Resistance in Intensive Care Units in Turkey

Intensive care units (ICU) are parts of the hospitals which provide multidisciplinary services, and have the highest incidence of nosocomial infections relative to their bed occupancy rates.

Especially infections with multidrug-resistant organisms and intensive use of antibiotics cause serious problems in intensive care units. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant enterococci, extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing Escherichia coli, Klebsiella species and other members of the Enterobacteriacea, Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa are the resistant organisms responsible from nosocomial infections in ICUs. Factors such as invasive procedures performed on patients, severity of the disease and insufficient infection control measures all accelerate infection rates. Additionally, use of parenteral, extended spectrum antibiotics such as third generation cephalosporins, antipseudomonal penicillins, carbapenems and fluoroquinolones play an important role in the development of nosocomial infections. Infections due to antibiotic resistant organisms not only increase morbidity and mortality, but also lead to prolonged hospital stay, excessive costs and increase in severe medical complications.

Organisms that cause infections in ICU's and their antibiotic susceptibility profiles should be monitored and treatment protocols should be revised accordingly in order to provide evidence- based and effective empirical antimicrobial treatment and to take necessary measures against nosocomial infections in hospitals, especially in ICU's. By way of performing surveillance studies, actual problems can be detected and targeted therapies based on supportive cumulative antibiogram results can be applied and life-threatening infections in ICU's can be controlled.

Key words: *Antibiotic resistance, Intensive care unit*

Alındığı tarih: 06.06.2016
Kabul tarihi: 18.09.2016
Yazışma adresi: Pınar Çıralıgil, Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana
Tel: (0322) 338 73 34
e-posta: pinarciraligil@yahoo.com
[§] 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde (18-22 Kasım 2015, Antalya) "Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının karar verme süreçlerine etkisi: Yoğun bakım ünitesi enfeksiyonları ve antimikrobiyal yönetim" panelinde sunulmuştur.

Antibiyotik direncinin merkez üssü: Yoğun Bakım Üniteleri

Yoğun bakım üniteleri (YBÜ) fizyolojik bakımdan stabil olmayan, altta yatan hastalığı olabilen ve hastanede yatan hastalar içinde klinik tablosu en ağır olan hastaların tedavisine yönelik en seri ve bilimsel, tıbbi ekip hizmeti veren tedavi birimleridir.

Hastane yatak kapasitelerinin yalnızca %5-10'unu kapsamalarına rağmen, hastane enfeksiyonlarının (Hİ) %20-25'i bu birimlerde ortaya çıkmakta ve ayrıca mortalite oranları da diğer birimlerden 2-2.5 kat daha yüksek görülmektedir. Hastanelerde antibiyotiklerin en sık kullanıldığı üniteler olan YBÜ'lerinde yatan hastaların ortalama %80'ine ilk yatışlarında en az bir antibiyotik tedavisi verilmektedir. Diğer hastane birimlerinde üriner enfeksiyon en sık saptanan nozokomiyal enfeksiyon olmasına karşın, YBÜ'lerde nozokomiyal enfeksiyonların sıklık sıralamasında alt solunum yolu enfeksiyonları ilk sırayı alırken, bunu üriner sistem enfeksiyonları, bakteremi ve cerrahi alan enfeksiyonları izlemektedir[1-3].

Antibiyotik direnci son yıllarda ürkütücü bir hızla artmakta ve sıklıkla dirençli mikroorganizmaların hastadan hastaya kolayca geçebildiği YBÜ'lerinde meydana gelen Hİ'larında sorun yaratmaktadır. YBÜ'lerinde antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalarla meydana gelen enfeksiyonların artışına; hastalığın şiddeti, YBÜ'lerinde kullanılan aletler, uygulanan invaziv girişimler yetersiz enfeksiyon kontrolü ve çok ilaçlı ampirik tedavi uygulamaları gibi faktörler etki etmektedir. Bunun yanında, geniş spektrumlu parenteral antibiyotiklerin (3. kuşak sefalosporinler, anti-pseudomonal penisilinler, karbapenemler, florokinolonlar gibi) tek başına aşırı kullanılması da önemli bir etken olmuştur. Ayrıca önceden antimikrobiyal tedavi uygulaması çoğul dirençli patojenlerin seçilmesine yol açabilir[4,5]. Böylece antibiyotiklere karşı gelişen direnç prevalansındaki artış, özellikle YBÜ'leri gibi birimlerde yatan kritik hastaların, ampirik antibiyotik tedavi seçimlerinde ciddi sorunlara neden olmaktadır.

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) ve karbapenemaz üreten *Escherichia coli, Klebsiella* türleri ve diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, *Acinetobacter* türleri ve *Pseudomonas aeruginosa* YBÜ'lerinde Hİ'larından sıklıkla sorumlu tutulan dirençli mikroorganizmalardır[6].

YBÜ'lerinde antibiyotik direnci nasıl önlenebilir?

Hastanelerde ve özellikle YBÜ'lerinde sürekli gözetim gerektiren Hİ'na yönelik önlemler alınması ve ampirik veya kanıta dayalı etkin antimikrobiyal tedavinin yapılabilmesi için, YBÜ'lerinde sıklıkla saptanan etkenlerin ve antibiyotik duyarlılıklarının izlenerek tedavi protokollerinin bu doğrultuda güncellenmesi gereklidir. Dolayısıyla yapılacak sürveyans çalışmaları ile gerçek sorunlar saptanıp, kümülatif antibiyogram sonuçları ile desteklenerek hedefe yönelik tedavi uygulanabilir ve YBÜ'lerinde yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar kontrol altına alınabilir.

Sürveyans çalışmaları-Gram negatif bakterilerde antimikrobiyal direnç

MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), EARSS (European Antimicrobial Resistance Epidemiology), SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program) ve Gram negatif hastane izolatlarında direnci araştıran HİTİT-1 ve HİTİT-2 gibi dünyadan ve Türkiye'den verileri içermekte olan bazı sürveyans çalışma programları bulunmaktadır.

Türkiye'de 2000-2003 yılları arasında, dokuz merkezin katılımı ile Hİ'nu izolatlarını içeren MYSTIC programı kapsamında, %31'i YBÜ'lerinden izole edilen kökenlerde *Enterobacteriacae* izolatlarında ilk sırada *E. coli* yer almıştır. *E. coli* izolatlarında GSBL üretiminin yıllara göre anlamlı biçimde arttığı (%12.5-32.1) gözlenirken, ikinci sıklıkta izole edilen *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde GSBL üretimi %47.1 ile %48.8 oranlarında gözlenmiştir. Karbapenemlerin ise *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde hâlen en etkin antibiyotikler olduğu vurgulanmıştır[7]. Bunun yanında, 2013 yılına gelindiğinde, YBÜ'lerinden izole edilen *A. baumannii* kökenlerinde çoklu ilaca dirençli kökenlerde yaygın karbapenem kullanımı sonucu, imipenem ve meropenem dirençlerinin %92 gibi oldukça yüksek oranda gözlenmektedir[8].

SENTRY programı kapsamında, 2000-2006 yılları arasında Türkiye'den *A. baumannii* kökenlerinde karbapenem dirençlerinin araştırıldığı çalışmada, imipenem duyarlılığı 2000 yılında %80.4 iken, 2006 yılına gelindiğinde %40 ve meropenem duyarlılığının aynı yıllar için sırasıyla %71.7 ve %40 oranları ile anlamlı derecede azaldığı belirtilmiştir ($p<0.001$)[9].

Yine SENTRY programının bir parçası olarak, 2009-2011 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri'nden 65 ve Avrupa'dan 36 merkezin katılımı ile gerçekleştirilen çalışmada, YBÜ'leri ve hastanelerin diğer birimlerde yatan hastalardan izole edilen Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. GSBL üreten kökenler ve *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa A. baumannii* gibi çoklu ilaca dirençli kökenlerde antimikrobiyal direncin bir sorun olarak hâlen devam etmektedir[10].

Her merkezde GSBL oluşturan bakterilerin sıklığı ve antibiyotik direnç oranları değişiklik gösterebileceğinden ülkemizde de tedaviye yön verebilmek amacıyla çalışmalar planlanmıştır. 2004 yılında altı merkezin katılımı ile gerçekleştirilen ve hastane izolatı Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci ve GSBL tiplerinin araştırıldığı HİTİT-1 çalışmasında, YBÜ'lerinden izole edilen *E. coli* kökenlerinde GSBL üretimi %26 olarak gözlenirken, 2007 yılında 13 merkezin katılımı ile gerçekleştirilen HİTİT-2 çalışmasında bu oranın %42'ye yükseldiği gözlenmiştir. *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde GSBL üretim oranları HİTİT-1 ve HİTİT-2 çalışmalarında sırasıyla %32 ve %41.4 olarak bulunmuştur. Her iki çalışmada da *E. coli* kökenlerinde karbapenem direnci gözlenmezken, *K. pneumoniae* kökenlerinde HİTİT-1 çalışmasında üç merkezde, HİTİT-2 çalışmasında dört merkezde karbapenem direnci olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar ile karbapenem direncinin *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* kökenlerinde merkezlere göre değişkenlik göstermekle birlikte yüksek olduğu, *K. pneumoniae* kökenlerinde ise artmaya başladığı, hastane izolatı olan *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, A. baumannii* kökenlerinin üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere karşı yüksek oranda dirençli olduğu sonucuna varılmıştır[11,12].

Tüm bu sürveyans çalışmaları irdelendiğinde, hastane enfeksiyonu izolatlarında saptanan bu dirençler YBÜ'leri enfeksiyonlarından izole edilen kökenlerin dirençlerini tam olarak yansıtmasa da genel olarak direncin giderek arttığı ve merkezler arasında değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Ülkemizde de farklı bölgelerden, farklı yıllarda yapılan çalışmalarda YBÜ'lerinden en sık izole edilen etkenler arasında ilk sırayı nonfermentatiflerin başta olduğu Gram negatif mikroorganizmalar alırken, ikinci sırada Gram pozitif mikroorganizmalar, sonrasında *Candida* türleri gelmekte ve direnç oranları merkezlere göre değişkenlik göstermektedir[13-15]. Türkiye'nin de içinde olduğu Avrupa ülkelerinin katılımı ile

1996 yılında gerçekleşen *Klebsiella* spp. kökenlerinde GSBL üretimi ve antibiyotik direncinin araştırıldığı bir çalışmada, GSBL üreten *Klebsiella* spp. kökenlerinin Avrupa'da YBÜ'lerinde yaygın olduğu (%22) ve sıklıkla diğer antimikrobiyallere çoklu direnç gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ülkemizden yalnızca iki merkezin katıldığı bu çalışmada, tüm ülke verilerini göstermemekle birlikte, *Klebsiella* spp. kökenlerinde GSBL üretimi (%59) diğer tüm ükelerden daha yüksektir[16]. İnan ve ark.[17] 2004-2010 yılları arasında YBÜ'lerinde cihaza bağlı enfeksiyonlardan izole edilen mikroorganizmaları irdeledikleri çalışmalarında, en sık izole edilen etkenleri *Acinetobacter* spp. (%35.3), *P. aeruginosa* (%20.6) ve *Enterobacteriaceae* (%17.6) olarak bildirirken, *Acinetobacter* spp. izolatlarının yıllara göre anlamlı biçimde arrtığını da gözlemişlerdir (2004'te %16.1 iken, 2010 yılında %40.6; p=0008). Çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter* spp. kökenlerinde direncin %5.8'den, %76.6'ya, *P. aeruginosa* kökenlerinde ise %6.8'den %53.1 gibi oldukça yüksek bir orana ulaşmış olması YBÜ'leri enfeksiyonlarının yönetimi açısından ciddi bir sorun ve çıkmaz olarak karşımızda olduğunu destekle-mektedir[17].

Ülkemizde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, merkezler arasında antibiyotik duyarlılıkları açısından farklılıklar olduğu görülmektedir. Hastane enfeksiyou kontrolü ve önlenmesinde ulusal standardizasyonu sağlamak amacıyla Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) sürveyans çalışmaları başlatılmıştır. UHESA 2011-2014 yillari raporlarında, *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinde GSBL oranlarının arttığı bildirilmektedir[18]. Yine aynı raporlarda direnç oranları yıllara göre giderek artmakta ve özellikle 2014 yılında YBÜ'lerinden izole edilen *A. baumannii* (%91.55) ve *P. aeruginosa* (%42.99) kökenlerinde karbapenem direnci ile *E. coli* ve *Klebsiella* spp. kökenlerinin GSBL üretimlerinin oldukça yüksek oranlarda olduğu izlenmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. UHESA 2011-2014 yılları GSBL üretimleri ve karbapenem dirençler[18] (% direnç).

	2011	2012	2013	2014
GSBL				
E. coli	44.56	46.01	48.83	58.77
Klebsiella spp.	48.27	50.61	49.69	62.86
Karbapenem				
Acinetobacter spp.	76.29	77.36	78.26	91.55
P. aeruginosa	34.01	33.91	35.36	42.99

Ülkemizde yapılan Gram negatif mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, yıllar ilerledikçe karbapenemlerin de dâhil olduğu çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter* spp. ve çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında ve GSBL üreten *Enterobacteriacae* kökenlerinde de artışlar olduğu gözlenmektedir[7,11,12,14,17] (Tablo 2, Tablo 3).

Tablo 2. Türkiye'de yapılan çalışmalarda yıllara göre GSBL üretimleri (%).

Etken	2000[7]	2001[7]	2002[7]	2003[7]	2005[11]	2007[12]	2012[14]
E. coli	15.6	12.5	19.6	32.1	26	42	34.5
Klebsiella spp.	49.7	47.2	49.1	48.8	32	41.4	18.2

Tablo 3. Türkiye'de yapılan çalışmalarda yıllara göre karbapenem dirençleri (%).

	2003[7]		2005 [11]	2007 [12]	2010[17]	2011[14]	
Etken	İMP	MRP	İMP	İMP	İMP	İMP	MRP
A. baumannii		42	52.2	55.5	85.5	92	76
P. aeruginosa	51	45	28.9	30.5	50	21	22
Klebsiella spp.	2	1	1.3	3.1	-	0	0

İMP:İmipenem; MRP:Meropenem

Hastaneler arasında farklı oranlarda saptanan antimikrobiyal direnç gözönüne alındığında, her merkezin ampirik antibiyotik kullanımı ve akılcı antibiyotik kullanım politikalarını belirlemesi ve mortalitesi yüksek Hİ'larının %25'inin ortaya çıktığı YBÜ'lerinde antimikrobiyal yönetimin öneminin vurgulanması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Sürveyans çalışmaları-Gram pozitif bakterilerde antimikrobiyal direnç

Türkiye'den yapılan çalışmalarda Gram pozitif mikroorganizmalar irdelendiğinde, YBÜ'lerinde *S. aureus* ve MRSA izolatlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş olması sevindiricidir. İnan ve ark.[17] *S. aureus* izolatlarında yıllara göre anlamlı bir azalma (2004 yılında %16.1 iken, 2010 yılında %6.2; p=0.009) olduğunu saptamışlardır. 2008 ve 2011 yıllarının ilk üç ayı içinde YBÜ'lerinde hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen MRSA kökenlerinde (2008'de %12.7, 2011'de %5.5) anlamlı bir azalma (p<0.001) olduğu bildirilmiştir[19]. 2011-2014 yılları UHESA verilerinde ise yine MRSA oranları giderek azalmasına rağmen (%55.33-%48.53) yukarda anılan çalışmalardan elde edilen verilere oranla oldukça yüksektir[18]. Farklı bölgelerden YBÜ'lerinden izole edilen MRSA kökenlerinin hiçbirinde VISA-VRSA saptanmaması, bu tip kökenlerin gelişimini önlemek için tedavide linezolid, kinopristin-dalfopristin, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotiklerin kullanılabilecek olması umut vericidir[20].

MRSA enfeksiyonları azalmakla birlikte, farklılıklar gösteren bu veriler ışığında her merkezin kümülatif antibiyogram verilerine dayanarak ampirik tedaviyi yönlendirmesi uygun olacaktır.

Günümüzde enterokoklara bağlı enfeksiyonlar, YBÜ'lerinde yatan hastalarda ikinci veya üçüncü sırada yer almaktadır. Ertürk ve ark.[14] çalışmalarında 2012 yılında *S. aureus* ve *Enterococcus* spp. kökenlerinde vankomisin ve linezolid direnci saptanmamış, ancak yüksek düzey gentamisin direnci (%25) ve yüksek düzey streptomisin (%50) dirençlerine dikkat çekilerek enterokok enfeksiyonları tedavisinde yüksek düzey aminoglikozid direnci varlığının araştırılması gerektiğini belirtmiştir.

Ülkemizde yapılan sürveyans çalışmaları kapsamında, enterokok enfeksiyonları açısından antimikrobiyal dirençler irdelendiğinde *Enterococcus* faecalis kökenlerine bağlı enfeksiyonların tedavisinde ampisilin ilk seçenek olarak görünmektedir. Linezolid ve glikopeptid dirençleri sık görülmemekle birlikte, direncin artmasını önlemek adına bu ilaçların kısıtlı kullanımlarının önemi vurgulanmalıdır. Buna karşın *Enterococcus faecium* enfeksiyonlarında glikopeptidlere direnç tedavide önemli bir sorun olarak karşımızdadır. *E. faecium* kökenlerinde daha fazla görülmekle birlikte her iki türde de yüksek düzey aminoglikozid dirençlerinin diğer antimikrobiyallere göre yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle yüksek düzey aminoglikozid direncinin rutinde saptanması ve duyarlı bulundukları durumlarda kombine tedavilerde kullanılmaları önem kazanmaktadır[21] (Tablo 4).

YBÜ'lerinde MRSA enfeksiyonları azalmakta, buna karşın, *Acinetobacter* spp.'ye bağlı enfeksiyonlar YBÜ'lerinde bir çıkmaz olarak karşımıza çıkmaktadır. *S. aureus*'a bağlı gelişen enfeksiyonlarda azalma olması sevindirici iken, neden *Acinetobacter* spp. kökenlerine bağlı enfeksiyonlarda artış gözlenmektedir? *Acinetobacter* spp.'nin kuru ortamlarda bile yaşamını sürdürebilmesi, hızlı transformasyon yeteneği, çevre koşullarında uzun süre canlılığını sürdürebilmesi nedeniyle olabilir[22]. UHESA verilerinde *Acineobacter* spp. kökenlerinde 2011 yılı raporlarında %76.29 olan karbapenem direncinin 2014 yılına gelindiğinde %91.55 olarak bildirilmiş olması ile, yeni milenyumda YBÜ'lerinde

Tablo 4. Enterokok İzolatlarında Direnç: UAMDSS 2011-2013 Raporu(21) (% direnç).

	2011		2012		2013	
	E. faecalis	*E. faecium*	*E. faecalis*	*E. faecium*	*E. faecalis*	*E. faecium*
Ampisilin	9.7	88.1	0	85.3	4.7	100
YDGD*	29.2	52.3	31.8	51.2	21.4	43.6
YDSD**	31.1	49	23.3	36	26	47.3
Linezolid	0.4	0.6	2	2.7	0.8	1.1
Vankomisin	0.9	17	0.6	16.7	0.9	22.8
Teikoplanin	0.2	15	0	16	0.2	18.4

**YDGD: Yüksek Düzey Gentamisin Direnci*
***YDSD: Yüksek Düzey Streptomisin Direnci*

sıklıkla çoklu ilaca dirençli gram-negatif basillere bağlı gelişen enfeksiyonların ciddi sorun oluşturduğu görülmektedir[18] (Tablo 1). Özellikle bu ünitelerde *A. baumannii, P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'ya bağlı gelişen enfeksiyonlar endişelerin odağında yer almaktadır.

Ne Yapabiliriz?

- Ülkemiz antimikrobiyal direnç (AMD) sorunlarını saptamak ve takip etmek,
- Ülkemize özgü direnç profillerini belirleyerek direnç oranlarının düşürülmesi konusunda belirlenecek politikaları yönlendirmek,
- Hİ kontrol çalışmalarına katkıda bulunmak ve
- Uluslararası network ağlarına katılılm ve bilgi paylaşımını sağlamak amacıyla,

ulusal düzeyde AMD sürveyans çalışmaları 2009 yılında kurulan Ulusal AMD Sürveyans (UAMS) bilimsel komisyonu ile başlayan çalışma kapsamında ülkemiz genelinde 35 üniversite hastanesi, 19 eğitim ve araştırma hastanesi ve 23 devlet hastanesi sisteme dâhil edilerek, kan ve BOS örneklerinden izole edilen *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, Streptococcus pneumoniae, S. aureus, E. faecalis* ve *E. faecium* ve 2014 yılından itibaren *A. baumannii* kökenlerinin antibiyotik direnç paternleri izlenmektedir.

Ülkemiz verilerini ve merkezlerin antibiyotik duyarlılıklarını değerlendirmek amacıyla sürveyans çalışmaları kapsamında, YBÜ'lerinde izole edilen kökenlerin antimikrobiyal dirençlerinin sunulduğu, ADSİ Çalışma Grubu ve Tıbbi Mikoloji Galışma grupları ile 2015 yılı içinde Ankara, İstanbul, İzmir, Malatya ve Mersin'de ortaklaşa düzenlenen bölgesel toplantılarda, YBÜ'lerinden izole edilen etkenler ve antibiyotik duyarlılıkları tartışıldı. Bu toplantılarda sunulan verilere göre YBÜ'lerinde sıklıkla Gram negatif mikroorganizmalara bağlı enfeksiyonların ilk sırada olduğu gözlendi. GSBL üretiminin bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte, hâlâ *E. coli* (%18-73) ve *K. penumoniae* (%24-75) izolatlarında bir sorun olarak devam ettiği gözlenirken, karbapenem direnci *Enterobacteriaceae* kökenlerinde izlenmekle birlikte, asıl sorun mikroorganizmanın *A. baumannii* (%85-94) olduğu bildirildi. Ayrıca *P. aeruginosa* kökenleri için bildirilen karbapenem dirençleri de (imipenem direnci %32.3, meropenem direnci %35.3) UHESA verileri ile benzer oranlarda olduğu gözlendi.

Genellikle ikinci sıklıkta izole edilen gram pozitif mikroorganizmlardan MRSA enfeksiyonlarının bölgelere göre değişkenlik göstermesi (%8-55.5) de yine merkezlerin kendi duyarlılık profillerini belirlemesi gerektiğini düşündürmektedir. VRE oranları da merkezlere göre değişkenlik göstermekle birlikte, vankomisin hâlen enterekok enfeksiyonları tedavisinde güvenilir bir seçenek olarak görülmektedir.

Bu toplantılarda sunulan veriler, farklı merkez-

lerde YBÜ'lerinden izole edilen *E. coli* ve *K. penumoniae* kökenlerinde bildirilen GSBL üretimleri ve UHESA verileri karşılaştırıldığında merkezler arasında farklılıklar olduğu görülmektedir (Tablo 1, Tablo 2). Ampirik tedavilerin belirlenmesinde ülke verilerinin de değerlendirilerek, tedaviye yön vermek amacıyla her merkezin kendi direnç oranlarını belirlemesi daha uygun olacaktır. GSBL oranlarındaki bu artış aynı zamanda çoklu direncin varlığını da göstermekte ve YBÜ'lerinde özellikle yaşamı tehdit eden enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması riskini de beraberinde getirmektedir.

Enfeksiyon kontrol önlemlerine dikkatin artmış olması, AMD sürveyans sistemi ve antibiyotik kısıtlama programları ve asinetobacter kaynaklı hastane enfeksiyonlarını önlemede kombine tedavide tigesiklin kullanımı *S. aureus* eradikasyonuna yardım etmiş olabilir. Ancak bu verilerin yapılacak araştırmalarla desteklenmesi gereklidir. *E. faecium* tedavisinde vankomisin, linezolid ve teikoplanin güvenilir gibi görünmekle birlikte, vankomisin dirençli kökenlerde teikoplanin direncinin de artması kullanım olasılığını azaltmaktadır.

Sonuç

- YBÜ'lerinde izlenen hastalarda gelişen enfeksiyonların sıklıkla antibiyotiklere çoklu dirençli mikroorganizmalarla meydana geldiği akılda tutulmalı,
- YBÜ'lerinde saptanan etkenlerin antimikrobiyal direnç paternleri düzenli olarak izlenmeli,
- Tedavi protokolleri bu doğrultuda güncellenmelidir.

Her merkezin kümülatif antibiyogram çalışmaları ile etken mikroorganizmaların antimikrobiyallere direnç durumları belirlenerek, bu doğrultuda ampirik antibiyotik kullanımı ve akılcı antibiyotik kullanımı ile dirençli enfeksiyonlarla mücadelede başarı sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

1. **Craven DE, Steger KA.** Epidemiology of nosocomial pneumoniae. *Chest* 1995;108 (2 Suppl):S1-16. https://doi.org/10.1378/chest.108.2_Supplement.1S
2. **Jarwis WR, Edwards JR, Culver DH, et al.** Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. *Am J Med* 1991;91 (Suppl 3B):S185-91. https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90367-7
3. **Kollef MH, Fraser VJ.** Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med* 2001;134:298-314. https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-4-200102200-00014
4. **Spencer RC.** Predominant pathogens found in the european prevalence of infection in intensive care study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:281-5. https://doi.org/10.1007/BF01695658
5. **Timsit JF, Harbarth S, Carlet J.** De-escalation as a potential way of reducing antibiotic use and antimicrobial resistance in ICU. *Intensive Care Med* 2014; 40:1580-2. https://doi.org/10.1007/s00134-014-3485-3
6. **Yalçın AN.** Yoğun bakım ünitesinde antibiyotik kullanımı ve direnç sorununa genel bakış. *ANKEM Derg* 2009; 23(Ek 2):E136-42.
7. **Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, et al.** Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000–2003) in Turkey: results of the MYSTIC program. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2007; 59:453-7. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.016
8. **Dede B, Kadanalı A, Karagöz G, Çomoğlu Ş.** Bektaşoğlu MF, Yücel FM. Yoğun bakım ünitesinde izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik dirençlerinin araştırılması. *Bakırköy Tıp Derg* 2013, 9:20-3. https://doi.org/10.5350/btdmjb201309105
9. **Gür D, Korten V, Ünal S, Deshpande Ml, Castanheira M.** Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program Sites. *J Med Microbiol* 2008; 57:1529-32. https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002469-0
10. **Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN.** Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2014, 78:443-8. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.025
11. **Gür D, Gülay Z, Arıkan Akan Ö, ve ark.** Türkiye'de hastane izolatı Gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: Çok merkezli HİTİT sürvayansının sonuçları. *Mikrobiol Bul* 2008; 42:537-44.
12. **Gür D, Hascelik G, Aydın N, et al.** Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother* 2009; 21:383-9. https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.4.383
13. **Sümerkan B.** Yoğun bakım ünitesinde Gram-negatif mikroorganizmalar ve direnç sorunu. *Yoğun Bakım*

Derg 2003; 3:129-34.

14. **Ertürk A, Çopur Çiçek A, Köksal E, Şentürk Köksal Z, Özyurt S.** Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2012; 26:1-9.
15. **Kiremitçi A, Durmaz G, Akgün Y, Kiraz N, Aybey A, Yelken B.** Anestezi yoğun bakım ünitelerinde çeşitli klinik örneklerde üretilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *İnfeks Derg* 2006; 20:37-40.
16. **Livermore DM, Yuan M.** Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:409-24. https://doi.org/10.1093/jac/38.3.409
17. **Inan A, Ozgultekin A, Akcay SS, et al.** Alterations in bacterial spectrum and increasing resistance rates in isolated microorganisms derived from device-associated infections in an intensive care unit of a teaching hospital in Istanbul (2004-2010). *Jpn J Infect Dis* 2012; 65:146-51.
18. UHESA 2011-2014 raporları [http://www.saglik.gov.tr adresinden] HM/dosya/1-88693/h/uhesa-analiz-2013.pdf (Erişim tarihi: Eylül 2016).
19. **Erdem H, Dizbay M, Karabey S, et al.** Withdrawal of *Staphylococcus aureus* from intensive care units in Turkey. *Am J Infect Dis* 2013; 41:1053-8. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.01.041
20. **Cesur S, Irmak H, Şimşek H, ve ark.** Türkiye'de yedi ildeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen MRSA suşlarında VISA-VRSA araştırılması ve antibiyotik duyarlılık surumlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46:352-8.
21. UAMDSS Raporları [http://uamdss.thsk.gov.tr/] (Erişim tarihi: Eylül 2016).
22. **Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S.** The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp: an overview. *Microbes Environ* 2011; 26:101-12. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(3):105-111, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.105

Araştırma

Farklı Çevre Koşullarında Klinik *Salmonella* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Araştırılması[§]

Zaliha BALTACIOĞLU*, Fethiye Ferda YILMAZ*, Mine HOŞGÖR LİMONCU*, Şöhret AYDEMİR, Alper TÜNGER****

** Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

*** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

ÖZET

Amaç: *Bu çalışmada, Salmonella spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının, biyofilm oluşturma kapasitelerinin araştırılması ve ayrıca biyofilm oluşumuna çeşitli ortam koşullarının ve siprofloksasin (CIP) varlığının etkilerinin incelenmesi amaçlandı.*

Gereç ve Yöntem: *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda 2012 yılında izole edilen 44 Salmonella spp. izolatı çalışmaya alındı. İzolatların CIP duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile ve biyofilm oluşturma kapasiteleri kristal viyole kullanılarak spektrofotometrik mikroplak yöntemi ile araştırıldı. Daha sonra, farklı sıcaklık, NaCl konsantrasyonu, pH değeri uygulanan koşullar altında ve farklı konsantrasyonlarda CIP (1/2MİK, MİK, 2MİK) varlığında biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırıldı. Orta ve güçlü düzeyde biyofilm oluşturabilen Salmonella izolatları için her bir parametrenin biyofilm oluşumuna etkisi diğer iki parametre sabit tutularak (sıcaklık: 4°C, 20 °C, 37°C, pH: 4, 6, 7.3, NaCl: %0.5, %4, %6) test edildi.*

Bulgular: *Standart koşullarda (37°C, pH:7.3, NaCl: %0.5), orta düzeyde biyofilm (%59) ve güçlü biyofilm (%5) oluşturan 28 izolatın pH:6'da pH:4'e, %6 NaCl'de %4 NaCl'ye ve 20°C de 4°C'ye göre daha iyi biyofim oluşturduğu gözlendi. Bir Salmonella izolatında CIP direnci saptanırken, bir izolat da orta duyarlı olarak bulundu. CIP, orta düzeyde biyofilm oluşturan bir izolatta hem biyofilm üretimini azalttı hem de önceden oluşmuş biyofilm tabakası üzerinde inhibe edici etki gösterdi.*

Sonuç: *Bu çalışma, incelenen Salmonella izolatlarının belirli çevre koşullarında daha fazla biyofilm oluşturarak yaşam şanslarını arttırabildiklerini ve CIP'nin biyofilm üretimi üzerine etkili olduğunu ortaya koymuştur.*

Anahtar kelimeler: *Biyofilm; Salmonella, siprofloksasin*

SUMMARY

Investigation of Biofilm Forming Capacity of Clinical Salmonella Isolatesunder Different Environmental Conditions

Objective: *This study aimed to investigate the antibiotic susceptibility and biofilm forming capacity of isolates of Salmonella spp., and the effect of different environmental conditions and the presence of ciprofloxacin (CIP) on biofilm forming ability.*

Materials and Methods: *Forty-four Salmonella spp. strains isolated in 2012 in Ege University, Faculty of Medicine, Bacteriology Laboratory of Department of Medical Microbiology, were included in this research. CIP susceptibilities were determined by microdilution method according to the CLSI recommendations and biofilm forming capacities were examined using crystal violet by spectrophotometric microplate method. Afterwards, the effects of different ambient temperatures, NaCl concentrations, pH values and presence of CIP (1/2MIC, MIC, 2MIC) on their biofilm forming capaciies were assessed. The impact of each parameter on biofilm formation in Salmonella strains with moderate and strong biofilm forming capacities at standard conditions (pH 7.3- NaCl 0.5%- 37°C) were tested singly while the other two parameters were kept at fixed levels (temperature: 4°C, 20°C, 37°C; pH: 4, 6, 7.3; NaCl: 0.5%, 4%, 6%).*

Results: *Under standart conditions, a total of 28 isolates of Salmonella spp. with moderate (59%) and strong biofilm (5%) forming capacities showed higher biofilm forming ability at pH 6, NaCl concentration of 6%, and ambient temperature of 20°C when compared with pH 4, NaCl concentration of 4%, and ambient temperature of 4°C. CIP resistance was found in one Salmonella spp. isolate, and one isolate demonstrated intermediate resistance to CIP. CIP inhibited both biofilm formation and showed inhibitory effect on pre-formed biofilm layer in a modarate biofilm producer.*

Conclusion: *This study revealed that Salmonella isolates increased their changes of staying alive in certain conditions by increasing their biofilm forming ability and CIP was found to be effective on biofilm formation.*

Key words: *Biofilm, Salmonella, ciprofloxacin*

Alındığı tarih: 28.06.2016
Kabul tarihi: 21.09.2016
Yazışma adresi: Mine Hoşgör-Limoncu, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir
Tel: (0232) 388 39 83 **Faks:** (0232) 388 52 58
e-posta: minehosgorlimoncu@yahoo.com.tr, mine.hosgor.limoncu@ege.edu.tr
[§] Çalışma, I. KLİMUD Günleri, GAP İllerinde Yaygın Görülen Enfeksiyonlar (13-14 Haziran 2013, Şanlıurfa) ve Microbiologia Balkanica 2013, 8th Balkan Congress of Microbiology, (2-5 October 2013, Veliko Tarnovo, Bulgaria) Kongreleri'nde sunulmuştur.

GİRİŞ

Salmonella enfeksiyonları dünya çapında yaygın olarak görülmektedir. *Salmonella*'lar insanlar, vahşi kuşlar, evcil hayvanlar ve kemiricilerin de aralarında bulunduğu birçok hayvan türünün bağırsaklarında bulunabilen bakteridir. İnsanların tükettiği, aralarında sebze ve meyvelerin de bulunduğu birçok gıdadan izole edilebilirler[1-3]. Bu bakteriler, asidik stres, düşük su aktivitesi ve yüksek sıcaklık gibi koşullara adapte olarak çeşitli yüzeylerde aylarca canlı kalabilmektedirler[4].

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak dezenfektanlara, antibiyotiklere ve kuruluğa karşı dayanıklı hâle gelmekte ve birçok dış etkenden korunabilmektedirler. Biyofilm içerisinde bulunan hücreler, kendi ürettikleri ve dış çevreye karşı kimyasal ve mekanik koruma sağlayan bir matriks içerisine gömülü olarak bulunmakta ve üzerlerinde çok çeşitli bileşiklerin birikmesine neden oldukları için hem endüstriyel alanda hem de tıp alanında büyük sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadırlar[5-7]. Endüstriyel sanitasyon uygulamalarına rağmen, *Salmonella*'lar, biyofilm oluşturma yetenekleri sayesinde, polimer, çelik ve cam gibi yüzeylerin yanı sıra organik yüzeylerde de canlılıklarını sürdürebilmektedirler[8,9].

Bu çalışmada, *Salmonella* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının, biyofilm oluşturma kapasitelerinin araştırılması ve ayrıca biyofilm oluşumuna çeşitli ortam koşullarının ve siprofloksasin (CIP) varlığının etkisinin incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2012 yılında izole edilen 44 *Salmonella* spp. izolatı çalışmaya alındı. Izolatların kotrimoksazol (CTX) (Oxoid Ltd., Birleşik Krallık), siprofloksasin CIP (Oxoid Ltd., Birleşik Krallık), kloramfenikol (CAM) (Oxoid Ltd., Birleşik Krallık), ampisilin (AMP) (Oxoid Ltd., Birleşik Krallık), duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi, CIP (Koçak Farma, İstanbul) duyarlılığı mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI (Clinical and Laboratory Institute) kriterlerine göre belirlendi[10]. Tüm izolatların standart yaşam koşullarındaki (37°C, pH:7.3, NaCl: %0.5) biyofilm oluşturma kapasiteleri, spektrofotometrik mikroplak yöntemi ile araştırıldı[5]. Ayrıca bu koşullarda orta düzey ve güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenen *Salmonella* izolatlarında, farklı sıcaklık, NaCl konsantrasyonu ile pH değerlerinin biyofilm oluşumuna etkisi, belirtilen parametrelerden biri değiştirilirken diğerlerinin sabit tutulduğu büyüme koşulları hazırlanarak (pH 4, NaCl %0.5, 37°C; pH 6, NaCl %0.5, 37°C; pH 7.3, NaCl %4, 37°C; pH 7.3, NaCl %6, 37°C; pH 7.3, NaCl %0.5, 4°C; pH 7.3, NaCl %0.5, 20°C) inkübe edildikten sonra aynı yöntem ile test edildi.

CIP'nin (1/2MİK, MİK, 2MİK) biyofilm oluşumuna ve oluşmuş biyofilm üzerine etkisi biri orta duyarlı ve biri dirençli iki izolatta spektrofotometrik mikroplak yöntemi ile test edildi[5]. İzolatların oluşturduğu biyofilm miktarlarındaki değişim, standart koşularda CIP varlığındaki inkübasyondan sonra ve inkübasyon sonrasında CIP ilavesinin ardından ölçüldü.

Değerlendirmede spektrofotometrik mikroplak ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, %0.25 oranında glukoz eklenerek hazırlanmış steril "Tryptic Soy Broth" (TSB) (Merck) besiyerinden 180 μl alınarak 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklar içerisine dağıtıldı ve üzerine 0.5 Mc Farland'a ayarlanmış 20 μl bakteri süspansiyonu steril koşullarda ilave edildi. Kuyucuklar 35°C'de 18-20 saat inkübasyon sonunda boşaltılıp steril fosfat tamponu ile yıkandı ve mikroplak ters çevrilip kendi hâline bırakılarak kuruması sağlandı. Daha sonra biyofilmin fiksasyonunu sağlamak amacıyla bu kuyucuklara

metanol ilave edildi ve 20 dakika sonra boşaltılıp ters çevrilerek oda sıcaklığında kurutuldu. Son olarak kuyucuklara %0.1'lik kristal viyole çözeltisi ilave edilip 15 dakika bekletilerek, oluşan biyofilmin boyanması sağlandı. Süre sonunda kuyucuklar boşaltılıp, musluk suyu ile yıkanarak boyanın fazlası uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı. Biyofilm tarafından tutulan boyanın görüntülenmesi amacıyla kuyucuklara %95'lik etanol ilave edildi ve 30 dakika sonra spektrofotometrede 570 nm'de okunan optik dansite değerlerine göre biyofilm oluşumu negatif, zayıf, orta ve güçlü olarak yorumlandı. Pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanıldı.

BULGULAR

Kırk dört *Salmonella* spp. izolatında CTX direnci saptanmazken, CIP ve CAM direnci %2.3, AMP direnci %13.63 olarak bulundu. Mikrodilüsyon yöntemi ile bir izolat dirençli (MİK: 1.5 μg/ml), bir izolat orta duyarlı (0.15 μg/ml), 42 köken ise CIP'ye duyarlı bulundu. CIP MİK aralığı 0.04-1.5 μg/ml olarak tespit edildi.

Standart üreme koşullarında (37°C, pH=7.3, NaCl= %0.5) orta düzeyde biyofilm (%59) ve güçlü biyofilm (%5) oluşturan toplam 28 izolat tespit edildi. Bu izolatlarla yapılan denemelerde pH=6'da pH=4'e, %6 NaCl'de %4 NaCl'ye ve 20°C'de 4°C'ye göre biyofilm oluşumunun arttığı gözlendi (Tablo 1, 2).

Mikrodilüsyon yöntemine göre, CIP dirençli (MİK 1.5 μg/ml) 2 numaralı izolat ve orta duyarlı (MİK 1.5 μg/ml) 19 numaralı izolatın orta düzey biyofilm oluşturan grupta olduğu görüldü. Denemeler sonucunda orta duyarlı olan 19 numaralı izolatta 1/2MİK, MİK, 2MİK (0.075; 0.15; 0.3 μg/ml) oranında uygulanan CIP'nin hem biyofilm üretimini hem de önceden oluşmuş biyofilm tabakasını orta düzeyden zayıf biyofilm düzeyine düşürdüğü, CIP'ye dirençli 2 numaralı izolatta ise uygulanan 1/2MİK, MİK, 2MİK (0.75; 0.15; 3 μg/ml) CIP'nin böyle bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi (Tablo 3, 4).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Salmonella* izolatlarında CIP ve CAM direnci %2.3, AMP direnci %13.63 oranında bulunurken, CTX direnci saptanmadı. Genel olarak literatür verilerine baktığımızda, *Salmonella*'larda antibiyotik direnci dünyada önemli bir sorundur. Özellikle gelişmekte olan ülkelerin çoğunda hayvan yetiştiriciliğinde ve insanlarda antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı sonucu çoklu dirençli *Salmonella* izolatlarında artış olmuştur. *Salmonella*'larda genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar diğer, gram-negatif bakterilerdeki kadar yaygın değildir ancak plazmid, integron ve transpozonlarla taşındıkları için aminoglikozid, tetrasiklin, sülfonamidlere çapraz direnç söz konusudur. 2010 yılında da Tayvan'dan karbapenem dirençli *Salmonella Typhimurium* kökeni bildirilmiştir. Çalışmamızda,

Tablo 1. Standart üreme koşullarında orta ve güçlü biyofilm oluşturan yirmi sekiz *Salmonella* spp. izolatının test edilen ortam parametrelerine göre değişen biyofilm oluşturma oranları[5].

		Farklı Ortam Koşullarında Değişen Biyofilm Oluşturma Özelliğine Göre İzolat Sayısı-N (%)					
		pH		NaCl (%)		Sıcaklık (°C)	
BOD	SKB	4	6	4	6	4	6
Güçlü	2 (7.1)	3 (10.7)	15 (53.6)	1 (3.6)	26 (92.9)	-	4 (14.3)
Orta	26 (92.9)	12 (42.9)	13 (46.4)	18 (64.3)	2 (7.1)	-	23 (82.1)
Zayıf	-	13 (46.4)	-	9 (32.1)	-	1 (3.6)	1 (3.6)
Negatif	-	-	-	-	-	27 (96.4)	-

BOD: Biyofilm oluşturma düzeyi, SKB: Standart koşullarda biyofilm (37°C, pH=7.3, NaCl= %0.5)

Tablo 2. Standart üreme koşullarında orta ve güçlü biyofilm oluşturan yirmi sekiz *Salmonella* spp. izolatının biyofilm oluşturma kapasitelerinin test edilen ortam parametrelerine göre değişimi.

		pH		NaCl (%)		Sıcaklık (ºC)	
İzolat No	**SKB**	**4**	**6**	**4**	**6**	**20**	**4**
1	O	O	G	O	G	G	Y
2*	O	Z	G	O	G	G	Y
6	O	Z	O	O	O	G	Y
7	O	Z	G	O	O	G	Y
8	G	O	G	Z	G	O	Y
13	O	Z	O	O	O	G	Y
14	O	Z	G	Z	O	G	Y
15	O	O	O	O	G	G	Y
16	O	O	G	Z	G	O	Y
17	O	Z	G	O	O	G	Y
18	O	Z	G	Z	O	G	Y
19#	O	Z	G	O	O	G	Y
20	O	O	G	O	O	G	Y
22	O	O	O	Z	O	G	Y
23	O	G	O	O	O	G	Y
26	O	O	G	O	O	G	Y
27	O	O	G	Z	O	G	Y
28	G	G	O	O	G	Y	G
29	O	O	O	O	G	Y	O
30	O	G	O	O	O	Y	G
36	O	O	Z	O	G	Y	O
38	O	O	Z	O	G	Y	O
39	O	O	O	G	G	Y	O
40	O	G	O	O	G	Y	G
41	O	O	Z	O	G	Z	O
42	O	O	O	O	G	Y	O
43	O	O	G	O	G	Y	O
44	O	O	O	Z	G	Y	O

*SKB: Standart koşullarda biyofilm (37 °C, pH 7.3, NaCl %0.5), G: Güçlü biyofilm, O: Orta biyofilm, Z: Zayıf biyofilm, Y: Biyofilm oluşturma yeteneği yok, *CIP dirençli, # CIP orta duyarlı*

Tablo 3. *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri ile CIP duyarlılığı arasındaki ilişki.

		Direnç Profili N(%)			$MİK_{50}$	$MİK_{90}$
	MİK Aralığı (μg/ml)	**S**	**I**	**R**	**(μg/ml)**	
Biyofilm (+) (n=28)	≤0.04 - 1.5	26 (93)	1 (3.5)	1 (3.5)	≤0.04	≤0.15
Biyofilm (-) (n=16)	≤0.04 - ≤0.04	16 (100)	-	-	≤0.04	≤0.04
TOPLAM (n=44)	≤0.04 - 1.5	42 (95.4)	1 (2.3)	1 (2.3)	≤0.04	≤0.04

S: Duyarlı. I: Orta duyarlı. R: Dirençli. (Duyarlılık sınırları S:≤0.06; I:0.12-0.5; R:≥1)

Tablo 4. Orta duyarlı ve dirençli iki izolatta CIP'nin biyofilm oluşturma kapasitesine etkisi.

İzolat No	**MİK (μg/mL)**	**Standart koşullarda biyofilm**	**½ MİK**	**MİK**	**2 MİK**
2	1.5	O	O	O	O
19	0.15	O	Z	Z	Z

O: Orta biyofilm, Z: Zayıf biyofilm

kullanılan izolatlarda daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında antibiyotik direncinin çok yüksek düzeyde olmadığı görülmektedir[11-13].

NaCl, hücreler için önemli besinsel gereksinim olup, NaCl'nin bulunmadığı ortamlarda bakteriyel büyümenin gerçekleşmediği bilinmektedir. Bu faktör bakteriyel büyümenin yanında biyofilm oluşumu üzerinde de olumlu etki yaratmaktadır. Hücre içi pH, hücrenin fizyolojisini ve bakteri üremesini etkileyen önemli bir faktördür. Mikroorganizmalar çevresel pH değişimleriyle yaygın olarak karşılaşırlar ve sonuç olarak alkali ya da asidin neden olacağı zararları en aza indirmek amacıyla çeşitli adaptif stratejiler geliştirirler. Pek çok bakteri, bazı genlerini düzenleyerek asit stresine yanıt verirler. *Salmonella*'lar da işleme ve saklama sırasında değişen çevresel koşullara (ısı, pH ve NaCl) adapte olarak yaşamda kalabilirler[14].

Çalışmamız kapsamında, *Salmonella* bakterisinin biyofilm oluşturan izolatları farklı çevresel parametrelere (sıcaklık: 4°C, 20°C, 37°C; pH: 4, 6, 7.3; NaCl: %0.5, %4, %6) maruz bırakılmıştır. Bu amaçla uygulanan ilk parametre farklı sıcaklık değerleridir. 20°C'ye maruz bırakılan *Salmonella* örneklerinin normal koşullara göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Ortama eklenen NaCl, biyofilm oluşumunda belirgin bir artışa neden olmuştur. En iyi biyofilm oluşumu %6 NaCl derişiminde meydana gelmiştir. Bu çalışma kapsamında uygulanan parametrelerden biri de farklı değerdeki pH uygulamaları olmuştur. Çalışmada, bakterilerin pH 6'da pH 4'e göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, gıdaların korunması için geleneksel bir uygulama olan pH ve NaCl seviyelerinin düzenlenmesi ile *Salmonella* izolatlarında biyofilm oluşumunun önlenebileceği gösterilmiş ve araştırmacılar bu uygulamanın gıda güvenliğine katkı sağlayabileceğini belirtmişlerdir[9]. Altmış *Salmonella enterica* ile farklı çevre koşullarında biyofilm üretiminin test edildiği bir çalışmada pH 5.5 (%58.3), %0.5 NaCl (%48.3) ve 25°C'de (%53.3) yüksek oranda biyofilm oluştuğu gözlenmiştir[3]. Ortam sıcaklığının 30°C ve pH'nın 6'ya yakın ve pepton oranının düşük tutulduğu bir çalışmada, biyofilm üretiminin daha yüksek olduğu belirtilmiştir[1]. Bu çalışma ve diğer çalışma sonuçları dikkate alındığında, *Salmonella* bakterilerinin standart yaşam koşullarından uzaklaşıldıkça yaşamda kalabilmek için biyofilm oluşturma eğiliminin arttığı görülmektedir. Biyofilm oluşumunda birçok genin ve tam olarak anlaşılamayan düzenleyici mekanizmalarının rol aldığı düşünülürse mikroorganizmaların biyofilm oluşturma özelliği izolattan izolata farklılık gösterebilmektedir. Bunun yanı sıra yapılan deneysel çalışmalarda da, gerçek yaşam ortamı tam olarak oluşturulamadığı için sonuçlar yanıltıcı olabilmektedir[1,9,14].

Salmonella spp. izolatlarında CIP direncinin değerlendirildiği bu çalışmada, CIP dirençli ve orta duyarlı iki izolatın orta düzeyde biyofilm oluşturan grup içerisinde yer aldığı görülmüştür. CIP, orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatların birinde hem biyofilm üretimini azaltmış hem de önceden oluşmuş biyofilm tabakası üzerinde inhibe edici etki göstermiştir. Ortamda biyofilm oluşumu öncesi ve sonrası CIP ilavesi sonucunda elde edilen veriler birbirinden farklı bulunmamıştır. CIP MİK değerinin alt ve üst konsantrasyonlarının aynı kökende biyofilm oluşturma düzeyini değiştirmediği saptanmıştır.

Antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının mikrobiyal kalıcılık ve direnç gelişimi üzerine etkileri çok fazla çalışılmamıştır. İlk kez Majtan ve ark.[15] klinik *S. Typhimurium* kökenlerinin biyofilm üretimi ile antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarındaki etkileşimini araştırmışlardır ve başka antibiyotiklerin de kullanıldığı bu çalışmada, CIP'nin ekzopolisakkarit üretimini

etkilemediği belirtilmiştir. Çalışmamızda, izolatların çoğunun CIP MİK değerleri çok düşük düzeyde (≤0.04 μg/ml) olduğundan bu antibiyotiğin sub-MİK konsantrasyonlarının biyofilme etkisi tüm izolatlarda çalışılamamıştır. Bir çalışmada, planktonik hücrelerle kıyaslandığında, biyofilm üreten *S. Typhimurium* kökenlerinin CIP'ye daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir[16]. Olgun biyofilm içinde üreyen bakteriler genelde antibiyotiklere dirençlidirler. Bu durumla ilgili iki hipotez öne sürülmektedir. İlki antibiyotiğin biyofilm içine geçişindeki yetersizlik, ikincisi ise biyofilm içindeki bakterilerin düşük hızda çoğalması ya da çoğalmıyor olması nedeniyle bakterilerin antibiyotiğe daha az duyarlı hâle gelmeleridir. Anderl ve ark.[17], CIP'nin biyofilm içindeki bakterilere yukarıdaki hipotezi destekler şekilde etkisiz olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmanın sonuçları, incelenen *Salmonella* izolatlarının belirli çevre koşullarında daha fazla biyofilm oluşturarak yaşam şanslarını arttırabildiklerini ve CIP'nin bazı izolatlarda biyofilm üretimi üzerine etkili etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Buna göre, bakterilerin çeşitli yüzeylere tutunması ve kolonizasyonunu engellemek için çevre koşullarının uygun şekilde düzenlenmesi ve gerektiğinde bir antibiyotik ilavesinin önemli yararlar sağlayacağı düşünülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (13ECZ004). Araştırmacılar biyofilm ölçümündeki katkılarından dolayı Dr. Fadime Aydın Köse'ye ve Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'na teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

1. **Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M.** Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *J Food Sci* 2011; 76 (Suppl 1):S12-6. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01936.x
2. **Álvarez-Ordó-ez A, Prieto M, Bernardo A, Hill C, López M.** The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Res Int* 2012; 45:482-92. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.002
3. **Lianou A, Koutsoumanis KP.** Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella* enterica under various environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 2012; 160:171-8. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002
4. **Gülmez D.** Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikler. In: Erdem B, eds. *Salmonella*. İstanbul: Logos Yayıncılık, 2013:52-64.
5. **Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38:428-32. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x
6. **Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, de Keersmaecker SCJ.** *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Res Int 2012; 45:502-31. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038
7. **Fàbrega A, Soto SM, Balleste-Delpierre C, Fernández-Orth D, Jiménez de Anta MT, Vila J.** Impact of quinolone-resistance acquisition on biofilm production and fitness in *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1815-24. https://doi.org/10.1093/jac/dku078
8. **Castelijn GAA, Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T.** Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella Typhimurium* strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling* 2012; 28:51-63. https://doi.org/10.1080/08927014.2011.648927
9. **Karaca B, Akcelik N, Akcelik M.** Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. *Biologia* 2013; 68:1-10. https://doi.org/10.2478/s11756-012-0138-2
10. **CLSI.** Clinical and Laboratory Institute. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third Informational Supplement, Document M100-S23, Clinical and Laboratory Standarts Institute, 2013.
11. **Perçin D.** Antimikrobiyal Direnci. In: Erdem B, eds. Salmonella. İstanbul: Logos Yayıncılık, 2013:200-9.
12. **Van TT, Nguyen HN, Smooker PM, Coloe PJ.** The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *Int J Food Microbiol* 2012; 154:98-106. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.032
13. **Zaidi MB, Estrada-García T, Campos FD, et al.** Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. *Front Microbiol* 2013; 4:288. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00288
14. **Spector MP, Kenyon WJ.** Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res Int* 2012; 45:455-81. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056

15. **Majtan J, Majtanova L, Xu M, Majtan V.** In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* isolated in Slovakia. *J Applied Microbiol* 2008; 104:1294-1301. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03653.x
16. **Tabak M, Scher K, Chikindas ML, Yaron S.** The synergistic activity of triclosan and cipro£oxacin on biofilms of *Salmonella Typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 301:69-76. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01804.x
17. **Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS.** Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1251-6. https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1251-1256.2003

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(3):112-121, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.112

Araştırma

Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Rektal Sürüntü Örneklerinden Saptanmasında BD MAX™ CRE Yönteminin Etkinliği§

Ayşe Nur SARI*,, Sema ALP ÇAVUŞ***, Zeynep GÜLAY***

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

***Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

****Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

ÖZET

Amaç: *BD MAX™ CRE Assay, karbapenem dirençli Enterobacteriaceae üyelerinde KPC, OXA-48 ve NDM direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan, DNA eldesi gibi basamakları otomatize olan, bir gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (PZT) kitidir. Bir seferde 24 örneğin çalışılabildiği bu sistemde, örneklerin yaklaşık 20-30 dakika süren ön işlemlenmesinden sonra, 2.5-3 saatte sonuç alınabilmektedir. Bu çalışmada, BD Max™ CRE Assay yöntem etkinliğinin Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarımızda kullanılan yöntem ile karşılaştırarak araştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde riskli ünitelerde yatan hastalardan alınan rektal sürüntü örneklerinde, BD Max™ CRE Assay ve Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı'mızda kullanılan kültür ve "in-house" polimeraz zincir tepkimesi (PZT) yöntemi ile karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae (KÜE) taranmıştır. Her iki yöntem için de 46 hasta örneği çalışmaya dâhil edilmiş olup, karbapenemaz genleri bilinen iki örnek de pozitif kontrol olarak eklenmiştir.*

Bulgular: *Enterobacteriaceae üyelerinde herhangi bir karbapenemaz geninin pozitifliği esas alınarak değerlendirme yapıldığında, her iki yöntemle de 26 örnekte Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz geni saptanmamıştır. On beş örnekte ise saptanan enzimler arasında fark olmakla birlikte, her 2 yöntemle de en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Kalan 5 örneğin 3'ünde kültür ve PZT yöntemi ile 2'sinde ise BD MAX™ CRE ile karbapenemaz geni saptanmıştır. BD MAX™ CRE için duyarlılık %88, özgüllük %90, negatif prediktif değer %93 ve pozitif prediktif değer %83 olarak hesaplanmıştır.*

Sonuç: *BD MAX™ CRE sistemi etkinliğinin belirlenmesinde daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim olmakla birlikte, çalışma bulgularımız, yöntemin karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae üyelerinin hızla saptanmasını ve taşıyıcıların belirlenmesini sağlamak amacıyla kullanılmaya uygun olduğunu göstermektedir.*

Anahtar kelimeler: *Hızlı tarama testleri, Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae, NDM/OXA-48/KPC*

SUMMARY

Efficiency of BD MAX™ CRE Method on Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae spp. from Rectal Swab Samples

Objective: *BD MAX™ CRE is a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay kit which determines KPC, OXA-48 and NDM genes where all steps like DNA extraction are automatized. Twenty- four samples can be loaded to the system in one run and results can be obtained in 2.5-3 hours. In this study, our aim was to investigate efficiency of BD MAX™ CRE assay's by comparing the system with in-house method used in our molecular epidemiology laboratory.*

Material and Method: *Carbapenemase- producing Enterobacteriaceae (CPE) were screened in rectal swab samples of patients hospitalized in units with increased risk for nosocomial infection. Both BD MAX™ CRE assay and culture followed by an "in-house" PCR method already in use in our molecular epidemiology laboratory, were performed. Forty-six rectal swab samples were included in the study and also two samples with predetermined carbapenemase gene types were included as positive controls in each run.*

Results: *When evaluation based on any carbapenemase gene positivity in Enterobacteriaceae members was performed, no carbepenemase genes were detected in twenty-six samples by both methods. In although different enzyme types were identified in fifteen samples, at least one carbapenemase gene was found by two methods. In three samples, carbapenemase genes were detected only by the "in house" method following the bacterial culture and for the remaining two only by BD MAX™ CRE assay. Sensitivity, specificity, positive, and negative predictive values for BD MAX™ CRE assay were 88, 90, 83, and 93%, respectively.*

Conclusion: *Although further studies are needed to determine the efficiency of BD MAXTM CRE system. Our results indicate that BD MAXTM CRE Assay is suitable for use in that it enables rapid detection of carbapenemase–producing Enterobacterteriaceae strains, and carriers.*

Key words: *Rapid screening tests, Carbapenemase producing Enterobacteriaceae, NDM/OXA-48/KPC*

Alındığı tarih: 01.08.2016
Kabul tarihi: 29.09.2016
Yazışma adresi: Zeynep Gülay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balçova / İzmir
e-posta: zeynepgulay62@gmail.com
§ Çalışma, XII. Antimikrobik Kemotarepi Günleri (01-03 Nisan 2016, Askeri Müze, Harbiye, İstanbul) simpozyumunda sunulmuştur.

GİRİŞ

Karbapenemler, çoklu ilaç dirençli bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde sık kullanılan, etkin tedavi seçenekleridir. Ancak, son yıllarda karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (KÜE) üyeleri, başta *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* olmak üzere, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yayılmakta ve tehlike oluşturmaktadır.

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem direnci birçok mekanizmaya bağlı olabilir. Bu mekanizmalar arasında porin kaybına bağlı dış membran geçirgenliğindeki değişimler ya da efluks sistemleri ile birlikte yüksek oranda AmpC enzimlerinin üretimi sayılabilir. Fakat tüm Gram negatif bakterilerde karbapenem direncinin en önemli nedeni karbapenemaz enzimlerinin üretimidir[1]. KÜE üyelerinde tanımlanan temel karbapenemazlar Ambler Sınıf A, Sınıf B ve Sınıf D içerisinde yer almaktadır. Sınıf A aktif bölgesi serin betalaktamazlardan, Sınıf B metallo betalaktamazlardan ve Sınıf D oksasilinazlardan oluşmaktadır[2]. Sınıf A'ya ait olan KPC enzimi günümüzde Amerika Birleşik Devletleri, İsrail, Güney Amerika ve Avrupa ile Asya'nın bazı ülkelerinde endemiktir. Dünyanın diğer bölgelerinde Sınıf B içerisinde yer alan NDM ya da ilk kez ülkemizde bulunup, endemik hâle gelen sınıf D OXA-48-benzeri karbapenemazlar baskın olarak bulunmaktadır[3,4]. Ülkemizde 2014 yılına ait 155 izolat ile yapılan çok merkezli çalışmada, karbapenemaz varlığı şüpheli *E. coli* izolatlarının %90.5'inde ve *K. pneumoniae* izolatlarının %92.5'inde genotipik olarak en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Saptanan enzim tipleri bulunma oranı en yüksekten en düşüğe OXA-48, NDM, VIM ve IMP olup, KPC enzimi bulunmamıştır[5]. Bu çalışma dışında, KPC enziminin seyrek olmakla birlikte, ülkemizden raporlandığı bilinmektedir[6,7].

KÜE yayılımının kontrol önlemleri arasında ilk sırada, bu mikroorganizmalar ile enfekte olan ve/veya gastrointestinal kolonizasyonu bulunup yayılımda rezervuar rolü oynayan hastaların saptanması gelmektedir. Kolonize hastaların sağlık kuruluşlarına girmesi ile KÜE izolatlarının kurum içi ve kurumlar arasında yayılımı hızla gerçekleşebilmektedir[8]. *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenemazların belirlenmesi, karbapenemlere duyarlı olmayan izolatların saptanması ve bunu takiben duyarlı olmayan izolatlarda karbapenemaz varlığının doğrulanması şeklinde genel olarak iki basamaklı bir süreci içerir. Doğrulama süreci için geliştirilmiş birçok fenotipik ve genotipik yöntem olup, hepsinin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemlerin seçiminde duyarlılık ve özgüllüklerinin yanı sıra yöntemin uygulanacağı sağlık kuruluşunun bölgesel direnç profilinin bilinerek seçim yapılması da önemlidir. Ayrıca karbapenemlere duyarlı olmayan izolatların taranmasında OXA-48-benzeri enzim üreten izolatların genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere ve bazı karbapenemlere duyarlı olabilmesi de bu bakterilerin tespitini zorlaştırmaktadır. Kültür temelli taramayı takiben KÜE varlığı antimikrobiyal duyarlılık testleri, hidroliz testleri ve/veya polimeraz zincir tepkimesi (PZT) gibi moleküler testler ile doğrulanma süreci yaklaşık olarak 72 saat alan, emek yoğun bir süreçtir. KÜE varlığının saptanması, sürveyans ve epidemiyolojik çalışmalar için de önem taşımakla beraber, bu izolatların hızla belirlenmesi özellikle bakteri popülasyonuna ilk kez giren bir enzimin anlaşılmasında, kritik hastalarda direnç profilinin belirlenip klinisyene hızlı bildiriminde, salgın durumları için enfeksiyon kontrol önlemlerinin en kısa sürede alınmasında da önemlidir. Ayrıca kolonize hastaların hızlı tespiti enfeksiyon kontrol önlemlerinin bir an önce uygulanması ve yayılımının önüne geçilmesi açısından büyük önem teşkil etmektedir[9]. Ülkemiz için özellikle, hastaneye başvuran göçmenlerin de taşıyıcılık açısından taramaları önerilmektedir.

Hızlı saptamanın önem kazandığı bu durumlar için ticari gerçek-zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) temelli yöntem kitleri hızlı, duyarlılığı/ özgüllüğü yüksek ve iş yükü az olan genotipik yöntemlerdendir. Bu ticari kitlerden bazılarında, DNA izolasyon aşaması da otomatize edilmiştir.

Bu amaçla kullanılabilecek sistemlerden BD MAX™ CRE Assay, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinde KPC, OXA-48 ve NDM direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan, DNA eldesi gibi basamakları otomatize olan, gerçek-zamanlı bir PZT kitidir. Bir seferde 24 örneğin çalışılabildiği bu sistemde, örneklerin yaklaşık 20-30 dakika süren ön işlemlenmesinden sonra, 2.5-3 saatte sonuç alınmaktadır. Eküvyon ile alınan örneklerde veya kültürde üremiş bakteri süspansiyonları ile çalışılabilmesi yanı sıra, kit, PZT işlemi sonunda örneklerin kültür ile işlemlenmesine de olanak sağlamaktadır. Yöntem, şimdilik araştırma amaçlı kullanım için önerilmektedir[10].

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde riskli ünitelerde yatan hastalardan alınan rektal sürüntü örneklerinde, BD MAX™ CRE Assay ve Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı'mızda kullanılan kültür ve "in-house" PZT yöntemi ile KÜE taranmış, sonuçlar karşılaştırılarak sistemin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

Çalışmaya, Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nden 18, Hematoloji Servisi'nden 12, Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi' nden 11 ve Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi'nden 5 hastaya ait toplam 46 sürüntü örneği dâhil edilmiştir. Tüm örnekler 2016 yılı Şubat ayına aittir. Ayrıca, NDM ve OXA-48 geni taşıdığı bilinen bir izolat da pozitif kontrol olarak çalışmaya alınmıştır. Her hastadan biri BD Max CRE için, diğeri kültür için olmak üzere eküvyonlu çubuk ile ikişer örnek alınmıştır. Kültür için alınan örnekler direkt olarak seçici besiyerine (besiyerinin içeriği "kültür" kısmında anlatılmıştır), BD Max CRE Assay için alınan örnekler ise steril cam tüplere alınarak kapalı bir şekilde laboratuvara getirilmiş ve aynı gün işlemlenmeye başlanmıştır.

Kültür

Rektal sürüntü örneklerinin taranmasında uygulanan örnek alım ve kültür yöntemi moleküler Epidemiyoloji Laboratuarı'mızda geliştirilmiştir. Yöntem çevresel örneklerde KÜE taramak amacıyla da kullanılmaktadır. Bu yöntemde örnekler alınır alınmaz seçici besiyerine (%5 oranında Tween 80, 6 μg/ml derişimde vankomisin ve 2 μg/ml derişimde imipenem içeren beyin kalp infüzyon) aktarılmıştır. Seçici besiyeri içerisinde getirilen örnekler, laboratuvara ulaşır ulaşmaz imipenem (2 μg/ml) içeren "Eosin Methylen Blue Agar" (EMB) besiyerine ekilmiştir ve bu EMB plakları ile birlikte seçici besiyerinde bulunan örnekler de zenginleştirme amacıyla bir gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik inkübasyondan sonra plaklar değerlendirmeye alınmıştır. Zenginleştirme örnekleri ise imipenem (2 μg/ml) içeren EMB besiyerlerine ikinci kez ekilerek ve bir gece inkübasyondan sonra üremeler açısından değerlendirilmiştir. Hem doğrudan hem de zenginleştirme sonrası ekim yapılan EMB agar plakları, üreme olmaması halinde 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra besiyerlerinde üreyen *Enterobacteriaceae* spp. ve diğer Gram negatif bakterilerden tür tanımı, biyokimyasal yöntemler ve VITEK 2.0 ile yapılmıştır. Ertapenem ve meropenem duyarlılıkları EUCAST önerilerine göre disk difüzyon ile değerlendirilmiştir[11].

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Karbapenem dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında NDM, OXA-48, KPC, IMP ve VIM genleri "in-house" PZT yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca ek olarak karbapenem dirençli nonfermentatif bakteriler için de (Pseudomonas aeruginosa için VIM, IMP, NDM ve *Acinetobacter* spp. için OXA-benzeri) karbapenemaz genleri de PZT ile belirlenmiştir. Kullanılan primerler, beklenen bant büyüklükleri ve reaksiyon koşulları Tablo 1'de gösterilmiştir.

BD MAX™ CRE Assay

Diğer grup sürüntü örnekleri BD Max CRE kiti uygulama prosedüründe belirtildiği şekilde, ön işleme alınmıştır. Bu amaçla eküvyonlar kit içerisinde bulunan örnek hazırlama tüplerine yerleştirilerek tüp steril bir şekilde kapatılmıştır ve her tüp bir dakika süre ile vortekslenmiştir. Örnek etiketleri BD MAX™ sistemine tanıtılarak tüpler ile DNA izolasyonu kiti ve gerçek zamanlı PZT kiti üretici önerileri doğrultusunda cihaza yerleştirilmiş ve cihaz uygun programda çalıştırılmıştır[10].

BULGULAR

Kültür

Kültür sonuçlarına göre tüm örnekler değerlendirildiğinde tanımlanan Gram negatif izolatlar ve sayıları şöyledir; *K. pneumoniae* (n=20), *E. coli* (n=8), *Acinetobacter* spp. (n=6), *P. aeruginosa* (n=5), *Enterobacter* spp. (n=2), *Proteus mirabilis* (n=1) ve *Stenotophomonas maltophilia* (n=1). Örneklerden izole edilen bakteri türleri ve antibiyotik duyarlılıkları Tablo 2'de gösterilmiştir. Tüm izolatların %60.5'inin (n=26) karbapenemlere duyarlı olmadığı görülmüştür. Bunların %69.2'si *K. pneumoniae* (n=18), %19.3'ü *Acinetobacter* spp. (n=5) ve %11.5'i *P. aeruginosa* (n=3) izolatıdır. *Enterobacteriaceae* spp. üyeleri değerlendirildiğinde ise karbapeneme duyarlı olmayan tüm izolatların *K. pneumoniae* izolatı olduğu görülmüştür.

Tablo 1. "In-house" PZT İçin kullanılan primer dizileri, büyüklükleri ve reaksiyon koşulları.

Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü	Reaksiyon Şartları
NDM-1-F:5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' NDM-1-R:5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'	826 bp(12)	94°C→5 dakika, ön denatürasyon 94°C→1 dakika, denatürasyon 54°C→1 dakika, birleşme 72°C→1.5 dakika, uzama 72°C→10 dakika, son uzama } 30 döngü
OXA-48A:5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3' OXA-48B:5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'	438 bp(13)	
IMP-A: 5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' IMP-B:5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3'	586 bp(14)	94°C→5 dakika, ön denatürasyon 94°C→1 dakika, denatürasyon 53°C→1 dakika, birleşme 72°C→1.5 dakika, uzama 72°C→10 dakika, son uzama } 30 döngü
VIM-A:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' VIM-B:5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'	388 bp(14)	
KPC-F: 5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3' KPC-R: 5'-TATTTTTCCGAGATGGGTGAC-3'	331 bp(15)	
OXA-51-F: 5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3' OXA-51-R: 5'- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	353 bp(16)	94°C→5 dakika, ön denatürasyon 94°C→25 dakika, denatürasyon 53°C→40 dakika, birleşme 72°C→50 dakika, uzama 72°C→6 dakika, son uzama } 30 döngü
OXA-23-F: GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA OXA-23-R: ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501 bp(16)	
OXA-24-F: GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA OXA-24-R: AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246 bp(16)	

Tablo 2. Örneklere göre bakteri tipleri, antibiyotik duyarlılıkları ve enzim tipleri.

Örnek	Servis	Bakteri	AMP	AMC	CTX	CAZ	ETP	IPM	MEM	GN	NN	AK	CIP	SXT	SCF	FOS**	Enzim Tipi	
																	Kültür+PZT	BD MAX
1	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	NDM	NDM
2	DYB	*P. mirabilis*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				
		Acinetobacter spp.*		R		R		R	R	S	S	R	R	R			OXA-23***	OXA-48+NDM
		*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	OXA-48+NDM	
3	DYB	Üreme saptanmadı																(-)
4	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	NDM	NDM
5	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	I	I	I	S	R	S	S	S		S	OXA-48	OXA-48
6	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	OXA-48+NDM	OXA-48+NDM
7	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	OXA-48+NDM	OXA-48+NDM
8	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	OXA-48+NDM	OXA-48+NDM
9	DYB	*E. coli*		S	S	I	S	S	S	S	I	S	S					
		Acinetobacter spp.*		R		R		R	R	R	S	R	R	R			OXA-23***	(-)
		*P. aeruginosa**				S		R	R	S	S	S	S				VIM***	
10	DYB	*E. coli*		S	S	S	S	S	S	S	I	S	R					
		P. aeruginosa				S		S	S	S	S	S	S					OXA-48
		*K. pneumoniae**		R	R	R	I	I	I	S	R	S	S	S		S	OXA-48	
11	DYB	Üreme saptanmadı																
12	ÇYB	Üreme saptanmadı																(-)
13	ÇYB	Üreme saptanmadı																(-)
14	ÇYB	*Enterobacter* spp.		R	S	S	S	S	S		I	S	S	S				(-)
15	ÇYB	Üreme saptanmadı																(-)
16	HEM	Üreme saptanmadı																(-)
17	HEM	*E. coli*		S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S		S		(-)
		K. pneumoniae		S	S	S	S	S	S	I	I	I	S	S		S		(-)
18	HEM	*E. coli*		S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S		S		
19	HEM	*E. coli*		S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S		S		(-)
20	HEM	Üreme saptanmadı																(-)
21	HEM	Üreme saptanmadı																(-)
22	HEM	Üreme saptanmadı																(-)
23	HEM	Üreme saptanmadı																(-)
24	HEM	Üreme saptanmadı																(-)
25	HEM	Üreme saptanmadı																(-)

Tablo 2. Örneklere göre bakteri tipleri, antibiyotik duyarlılıkları ve enzim tipleri.

Örnek	Servis	Bakteri	AMP	AMC	CTX	CAZ	ETP	IPM	MEM	GN	NN	AK	CIP	SXT	SCF	FOS**	Enzim Tipi	
																	Kültür+PZT	BD MAX
26	AYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	NDM	NDM
		E. coli		R	S	S	S	S	S	I	R	I	R	S		S		
27	AYB	Üreme saptanmadı																(-)
28	AYB	*E. coli*		R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R		S		(-)
29	AYB	Üreme saptanmadı																(-)
30	AYB	*P. aeruginosa**				S		R	R	R	R	S	S				VIM***	(-)
31	AYB	Üreme saptanmadı																(-)
32	AYB	Üreme saptanmadı																(-)
33	AYB	*K. pneumoniae*		R	R	I	S	S	S	R	R	S	R	R		S		(-)
34	AYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	NDM	NDM
35	AYB	Üreme saptanmadı																(-)
36	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	NDM	OXA-48+NDM
		S. maltophilia												S				
37	DYB	*P. aeruginosa**				R		R	R	S	S	S	S				VIM***	OXA-48+NDM
		*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	NDM	
38	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	OXA-48+NDM	(-)
39	DYB	*Acinetobacter* spp.*		R		R		R	R	R	S	R	R	R			OXA-23***	OXA-48
40	DYB	*E. coli*		S	S	S	S	S	S	I	R	I	R	S				OXA-48
		Acinetobacter spp.		R		S		S	S	S	S	S	R	R				
41	DYB	Üreme saptanmadı																(-)
42	DYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	OXA-48+NDM	OXA-48
		Acinetobacter spp.*		R		R		R	R	R	S	R	R	R			OXA-23***	
43	ÇYB	*Enterobacter* spp.		R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S				OXA-48+NDM
		*K. pneumoniae**		R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R		S	OXA-48	
44	HEM	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R		S	OXA-48	(-)
45	HEM	*K. pneumoniae**		R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R		S	OXA-48	(-)
46	AYB	*K. pneumoniae**		R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R		S	OXA-48	OXA-48+NDM
		Acinetobacter spp.*		R		R		R	R	R	S	R	R	R			OXA-23***	
		P. aeruginosa				S		S	S	S	S	S	S					

HE DYB: Dahiliye Yoğun Bakım, ÇYB: Çocuk Yoğun Bakım, HEM: Hematoloji, AYB: Anestezi Yoğun Bakım

**Karbapenemlere duyarlı olmayan izolatlar*

***CLSI kriterlerine göre uygulanmıştır [17].*

****Kit tarafından saptanmayan tür/enzim*

"in house" PZT ve BD MAX™ CRE

Enterobacteriaceae üyelerinde herhangi bir karbapenemaz geninin pozitifliği esas alınarak, değerlendirme yapıldığında, her iki yöntemle de 26 örnekte *Enterobacteriaceae* üyelerinde herhangi bir karbapenemaz geni saptanmamıştır. On beş örnekte ise saptanan enzimler arasında fark olmakla birlikte, her iki yöntemle de en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. On beş örneğin onunda kültürü takiben yapılan PZT uygulaması ve BD MAX CRE sonuçları tamamen uyumluluk göstermektedir (yalnızca NDM belirlenen dört örnek, OXA-48 ve NDM birlikte belirlenen dört örnek ve yalnızca OXA-48 belirlenen iki örnek olmak üzere). Saptanan enzimler arasında farklılığın olduğu beş örnek için ise bulgular şöyledir: BD MAX CRE sistemi dört örnekte hem OXA-48 hem NDM saptarken laboratuvarımızdaki yöntem sonucunda bu örneklerin ikisinde yalnızca NDM, ikisinde ise yalnızca OXA-48 saptanmıştır. Bir örnekte ise laboratuvarımızda uygulanan yöntem hem OXA-48 hem NDM saptarken BD MAX sistemi yalnızca OXA-48 bulmuştur. Yöntemlerden yalnızca biri ile enzim saptanan beş örneğin üçünde kültür ve PZT yöntemi ile (iki örnekte OXA-48 ve bir örnekte OXA-48+NDM) ikisinde ise BD MAX™ CRE ile (OXA-48) karbapenemaz geni saptanmıştır. Her iki yöntemle de örneklerin hiçbirinde KPC enzimi saptanmamıştır. Örneklere göre tanımlanan bakteri tipleri, antibiyotik duyarlılıkları ve her iki yöntemle belirlenen enzim tipleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Rektal sürüntü örneklerinin her iki yöntemle karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* açısından değerlendirilmesi.

	BD MAX CRE		
Kültür + PZT	**Pozitif**	**Negatif**	**Toplam**
Pozitif	**15**	3	18
Negatif	**2**	26	28
Toplam	**17**	29	46

Çalışma bulgularına göre BD MAX™ CRE Assay için duyarlılık %88, özgüllük %90, negatif prediktif değer %93 ve pozitif prediktif değer %83 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3).

Ayrıca kültür ve PZT yönteminde örneklerden izole edilen karbapenem dirençli beş *Acinetobacter* spp. ve üç *P. aeruginosa* izolatında sırası ile OXA-23 ve VIM genleri bulunmuştur.

TARTIŞMA

Günümüzde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanması genellikle kültürde üretilen izolatların duyarlılık testlerini takiben yapılan doğrulama testleri (fenotipik ya da genotipik testler) ile sağlanmaktadır. Bu süreç 2-5 gün arasında sonuç veren bir süreçtir. Karbapenemaz üreten veya karbapenem dirençli izolatların tanımlanması ile etkin antimikrobiyal tedavinin zamanında başlanması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınarak salgınların önüne geçilmesi arasındaki kritik ilişki nedeniyle bu izolatların hızla belirlenmesi gerekmektedir[10]. Ayrıca KÜE ile kolonize hastaların hasta popülasyonuna bir kez girmesi ile sağlık kuruluşunda ve kuruluşlar arasında hızla yayılması da enfeksiyon kontrolü açısından hızlı testlerin kolonize hasta tespitinde kullanılmasının önemini göstermektedir[8].

Çalışmamızda etkinliği araştırılan BD MAX™ CRE yöntemi, BD MAX™ sistemi ile kullanılabilen bir gerçek-zamanlı PZT kitidir. KÜE tespitinde moleküler temelli testlerin fenotipik testlere göre önemli avantajları bulunmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir ve BD MAX™ CRE sisteminde olduğu gibi bazıları direkt klinik örnekten karbapenemaz genlerini tespit edebilmektedir[9]. BD MAX™ CRE sistemi sürüntü örnekleri ve bakteri süspansiyonları ile çalışabilmektedir. Günümüzde kan kültürü sistemlerinden ya da

solunum örneklerinden doğrudan karbapenemaz genlerini belirleyen moleküler temelli sistemler de bulunmaktadır[18,19]. Rektal sürüntü örneklerinden direkt olarak karbapenemaz genlerini tanımlayan sistemlerden, GeneXpert Carba-R (Cepheid) sistemi Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımı FDA onayı almış bir sistem olup, bunun dışında Check-Direkt CPE, RenDx Carbaplex assay ve Amplidiag CarbaR+VRE gibi sistemler de bulunmaktadır. Bu sistemlerin en önemli kısıtlamasının bazı karbapenemaz genleri için düşük pozitif prediktif değer olduğu bilinmektedir[10]. Çalışmamızda, BD MAX™ CRE için pozitif prediktif değeri %83 olarak bulunmuştur. Yakın bir tarihte GeneXpert Carba-R (Cepheid) ile yapılan çok merkezli çalışmada, bu değer %95 olarak bildirilmiştir. Bu sistemde, BD MAX™ CRE' den farklı olarak IMP ve VIM genleri de saptanabilmektedir[20]. Ancak, örnekte bir *Enterobacteriaceae* üyesi ile birlikte bu metallo beta-laktamazları üreten bir non-fermentatif bulunması hâlinde GeneXpert Carba-R sistemi KÜE bulgusu vermektedir (yayımlanmamış bulgu).

Çalışmamız kültür bulgularına göre örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem dirençli izolatların hepsi *K. pneumoniae i*zolatıdır. Bu izolatlara "in-house" olarak NDM, OXA-48, KPC, IMP ve VIM PZT uygulanmış ve %52.6'sında (n=10) OXA-48+NDM, %26.3'ünde (n=5) yalnızca OXA-48 ve %21.1'inde (n=4) yalnızca NDM geni belirlenmiştir. Bu sonuçlar hastanemiz ve ülkemizde yaygın enzim tipinin OXA-48 ve NDM olmasıyla uyumludur. Hızlı testlerin seçiminde yerel epidemiyolojik bilgi ve yaygın karbapenemaz tipleri önemli bir kriterdir [10]. BD MAX CRE sistemi de üç gen bölgesini (NDM, OXA-48 ve KPC) belirlemesi yönünden ülkemizde KÜE tespiti için uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızın bir diğer bulgusu örneklerde karbapenem dirençli beş *Acinetobacter* spp. ve iki *P. aeuroginosa* izolatının tanımlanmış olmasıdır. "in house" PZT ile *Acinetobacter* spp. izolatlarında OXA-23 ve *P. aeuroginosa* izolatlarında VIM genleri bulunmuştur. BD MAX™ CRE sistemi bu karbapenemaz genlerini belirleyememektedir. VIM genini KPC, OXA-48 ve NDM ile birlikte belirleyen ve yine gerçek zamanlı PZT temelli bir sistem olan Check-direct CPE de duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir sistem olup, etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, pozitif prediktif değeri düşük bulunmuştur[21]. Lee ve ark.'nın[22] geliştirdiği ve BD MAX™ CRE sisteminde olduğu gibi gerçek zamanlı PZT temelli olan sistem de aynı KPC, NDM ve OXA-48 genlerini etkin bir şekilde belirleyebilmektedir. Fakat bu sistemde bakteri lizatı hazırlama aşaması iş yükü ve süreyi uzatmaktadır.

Kültür+ PZT yönteminde, sıvı besiyerinde zenginleştirme işlemi saptanma oranlarını arttırmaktadır. Ancak bu yöntemle sonuçların çıkması en az dört gün sürmektedir. Ev yapımı yöntemin avantajları, maliyetinin düşük olması, karbapenemlere dirençli tüm Gram negatif bakterilerin saptanabilmesi ve sonraki çalışmalar için saklanabilmesidir. Fakat emek yoğun olduğu için ancak salgın sırasında veya riskli ünitelerde aylık taramalarda kullanılabilmektedir.

BD MAX™ CRE sisteminin en önemli avantajı hızlı sonuç alınması ve iş yükünün az oluşudur. Bu çalışmada, denenmemesine karşın, sistem ayrıca kültür yapılmasına da izin vermektedir. Böylelikle taramada pozitif çıkan örneklerden kültür işlemleri de yapılarak izolatlar elde edilebilir. BD MAX™ CRE'nin en önemli dezavantajı maliyetidir. Bu dezavantaj çoğu moleküler temelli hızlı testlerde bulunmaktadır. Yine diğer PZT temelli testlerde olduğu gibi yalnızca sistemde hedeflenen karbapenemaz genlerinin belirleniyor olması, yeni karbapenemaz genlerinin gözden kaçırılmaması için dikkatli olmayı gerektirmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız bulgularına göre BD MAX™ CRE, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin hızlı saptanmasını ve taşıyıcıların belirlenmesini sağlamak amacıyla kullanılmaya uygundur. Sistem kullanılırken PZT temelli testlerin hepsinde bulunan yeni karbapenemaz genlerinin gözden kaçırılması noktasına dikkat edilmelidir. Henüz araştırma amaçlı önerilen sistem ile yapılacak çalışmalar, sistem etkinliğini daha da iyi ortaya koymaya yardımcı olacaktır.

Teşekkür

Yardımlarından dolayı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Feriha Çilli'ye, BD (Becton, Dickinson and Company) Türkiye'ye ve Sayın Deniz Ertekin Kandemir'e (Nukleus, İzmir), Sayın Meral Biçmen'e ve Dokuz Eylül Üniversitesi Enfeksiyon Kontrol Ekibi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Matsumura Y, Pitout JD.** Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Expert Rev Mol Diagn* 2016; 16:783-94. https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1172964
2. **Nordmann P, Naas T, Poirel L.** Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1791-8. https://doi.org/10.3201/eid1710.110655
3. **Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill 2015; 20.
4. **Temkin E, Adler A, Lerner A, Carmeli Y.** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1323:22-42. https://doi.org/10.1111/nyas.12537
5. **Çakar A, Akyön Y, Gür D ve ark.** Türkiye'de 2014 yılı içinde izole edilen karbapeneme dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:21-33. https://doi.org/10.5578/mb.10695
6. **Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, Turkoglü S, Hakko E, Nordmann P.** KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect* 2014; 2:50-1. https://doi.org/10.1002/nmi2.42
7. **Zahedi Bialvaei A, Samadi Kafil H, Ebrahimzadeh Leylabadlo H, Asgharzadeh M, Aghazadeh M.** Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. *Iran J Microbiol* 2015; 7:226-46.
8. **Lin MY, Lyles-Banks RD, Lolans K, et al; Centers for Disease Control and Prevention Epicenters Program.** The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* 2013; 57:1246-52. https://doi.org/10.1093/cid/cit500
9. **Banerjee R, Humphries R.** Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence* 2016; 11:1-13. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1185577
10. Instructions for BD MAX™ CRE Assay, Ref. 443379, 2013.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 3.1, valid from 2013-02-11. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf (Erişim tarihi: Eylül 2016).
12. **Samuelsen Ø, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A.** Identification of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Norway. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:670-2. https://doi.org/10.1093/jac/dkq483
13. **Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P.** Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:15-22. https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004
14. **Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL.** Detection of Pseudomonas aeruginosa producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3129-35. https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005
15. **Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, et al.** Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2680-2. https://doi.org/10.1128/AAC.00158-08
16. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:351-3. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004
17. **CLSI.** Clinical and Laboratory Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-First Informational Supplement. Document M100-S21, Clinical and Laboratory Standarts Institute, 2011.
18. **Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, et al.** Evaluation of the FilmArray blood culture identification panel: Results of a multicenter controlled trial. *J Clin Microbiol* 2016; 54:687-98. https://doi.org/10.1128/JCM.01679-15
19. **Kunze N, Moerer O, Steinmetz N, Schulze MH,**

Quintel M, Perl T. Point-of-care multiplex PCR promises short turnaround times for microbial testing in hospital-acquired pneumonia-an observational pilot study in critical ill patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015; 14:33. https://doi.org/10.1186/s12941-015-0091-3

20. **Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, et al**. Multisite evaluation of Cepheid Xpert-Carba-R Assay for the detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1814-9. https://doi.org/10.1128/JCM.00341-16
21. **Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, van Zwet A.** Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77:316-20. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.007
22. **Lee TD, Adie K, McNabb A, et al.** Rapid detection of KPC, NDM, and OXA-48-like carbapenemases by Real-Time PCR from rectal swab surveillance samples. *J Clin Microbiol* 2015; 53:2731-3. https://doi.org/10.1128/JCM.01237-15

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(3):122-127, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.122

Araştırma

Antalya Yöresinde Bazı Otel Yemeklerinde *Staphylococcus aureus* Enterotoksini Araştırılması

İbrahim YILDIRIM*, Rasih FELEK**

** Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü,*

*** Akdeniz Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı*

ÖZET

Amaç: *Micrococcaceae familyasının üyesi olan Staphylococcus aureus insanlarda gıda zehirlenmelerinde en önemli bakterilerden biridir. Gıdalarda bulunması gıda işletmeleri ile büyük mutfaklarda hijyen eksikliğinin göstergesi olarak kabul edilir. Bu çalışma Antalya'da, turizm sektöründe hizmet veren otel işletmelerinde S. aureus enterotoksin varlığı ve tipinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Bu çalışma altı otelden alınan sıcak yemek örneklerini (her otelden onar örnek) içermektedir. Alınan gıda örnekleri önceden hazırlanan egg-yolk tellurite emusion içeren Braid Parker Agar'a ekilerek identifiye edilmiştir. İzole edilen S. aureus'lar enterotoksin analizi "Reversed Passive Latex Agglutinasyon" (Oxoid, Birleşik Krallık) ticari kiti ile yapılmıştır.*

Bulgular: *Altmış adet yemek örneğinin 21'inde (%35) S. aureus ile kontamine olduğu, bunların sayılarının $1.0x10^3$-$4.7x10^4$ kob/g olduğu bulunmuştur. S. aureus sayısının $1.0x10^3$'ten fazla olan 12 gıda örneğinin altısında enterotoksin pozitif bulunmuştur. Birinci otelde bir adet stafilokokkal enterotoksin B pozitif, ikinci otelde bir adet stafilokokkal enterotoksin C pozitif, üçüncü otelde bir adet stafilokokkal enterotoksin C pozitif saptanırken, dördüncü otelde pozitif enterotoksin bulunamamış, beşinci otelde bir adet stafilokokkal enterotoksin B pozitif, altıncı otelde bir adet stafilokokkal enterotoksin A ve bir adet stafilokokkal enterotoksin D pozitif olarak bulunmuştur. İncelenen 21 S. aureus bakterisinden stafilokokkal enterotoksin A, bir gıda örneğinde (%4.8), enterotoksin B iki gıda örneğinde (%9.4), enterotoksin C iki gıda örneğinde (%9.4) ve enterotoksin D bir gıda örneğinde (%4.8) pozitif bulunmuştur.*

Sonuç: *Genelde her şey dâhil şeklinde hizmet veren otellerde sıcak yemekler en fazla hassasiyet gerektiren bölümünü oluşturmaktadır. Isıl işlem görmeleri toksin barındırmama açısından etkili olmamaktadır. Genel sanitasyon kuralları ve HACCP gibi gıda güvenliğine, personel hijyenine dönük uygulamalara daha fazla önem verilerek tüketici sağlığı daha iyi korunabilir.*

Anahtar kelimeler: *Gıda intoksikasyonu, hazır yemek, Staphylococcus aureus enterotoksin*

SUMMARY

Investigation of Staphylococcus aureus Enterotoxins in the Hotel Food in Antalya, Turkey

Objective: *Staphylococcus aureus, a member of the Micrococcaceae family, is one of the most important bacteria causing food poisoning in humans. The presence of this bacteria in food points to the lack of hygiene in, hotel kitchens, and food enterprises. This research was carried out in order to search for the presence, and type of Staphylococcus aureus enterotoxin in in hotels serving in the tourism sector.*

Materials and Methods: *This study was performed with hot meal samples obtained from six hotels (10 samples for each). Food samples were inoculated on Braid Parker Agar containing pre-prepared egg-yolk tellurite emulsion. Isolated S. aureus bacteria were analyzed for enterotoxin using the commercial kit of "Reversed Passive Latex Agglutination" (Oxoid, United Kingdom).*

Results: *Out of 60 meal samples 21(35%) were found to be contaminated with S. aureus in quantities of $1.0x10^3$ - $4.7x10^4$ cfu/g. Enterotoxin was found to be positive in six meal samples out of 12 in which the quantity of S. aureus was more than 1.0x10 cfu/g 3. Among food samples obtained from hotels one staphylococcal enterotoxin B positivity in the first, one staphylococcal enterotoxin C in the second, one SEC positivity in the third, one staphylococcal enterotoxin A, and one staphylococcal enterotoxin D positivities in the sixth hotel were detected. In the fourth otel any endotoxin positivity was not found. Among 21 S. aureus isolates investigated, enterotoxin A positivitywas found in one (4.8 %), enterotoxin B positivity in two (9.4%),enterotoxin C positivity in two (9.4%), and enterotoxin D positivity in one (4.8%) food sample.*

Conclusion: *In hotels serving on the basis of all- inclusive system, hot meals require extra attention for food safety. Heat-processing is not effective in terms of food intoxication. To protect consumer health in a better way, it is vital to pay extra attention to general sanitation rules, staff hygiene, and handling food safety in compliance with HACCP.*

Key words: *Food intoxication, fast food, Staphylococcus aureus enterotoxin*

Alındığı tarih: 30.06.2016
Kabul tarihi: 07.12.2016
Yazışma adresi: Rasih Felek, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı H-Blok Kat:1 Dumlupınar Bulvarı, 07100 Konyaaltı / Antalya
e-posta: rasihf@akdeniz.edu.tr

GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalıklar patojen mikroorganizma veya toksinleri ile kontamine olan gıdalar ile oluşmaktadır. Bunun sonucunda gastrointestinal semptomlar ortaya çıkmaktadır. Bunlardan intoksikasyon tip gıda zehirlenmesinde patojen bakterinin salgıladığı toksin önemlidir. Enterotoksinler aslında bir ekzotoksindir. Sindirim sistemini etkilediklerinden bu ismi alırlar. *Staphylococcus aureus* enterotoksini insan beynindeki kusma merkezini uyararak kusmaya neden olmaktadır.

Staphylococcus aureus toksinin gıda zehirlenmelerdeki payı ülkelere göre değişmekle birlikte, %15-45 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Dünyada yaklaşık olarak 1.9 milyon insan gıda zehirlenmesinden yaşamını kaybetmektedir. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü verilerine göre, 2005 yılı Türkiye'de rapor edilen gıda zehirlenme sayısı 26.298 olarak bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri, İngitere ve Hollanda'daki istatistiklere göre gıda kaynaklı hastalıkların %70'ten fazlası, toplu yemek servisi veren işletmelerde gerçekleşmiştir[1-3].

Staphylococcus aureus uygun koşullar altında çoğalmakta ve suşa bağlı olarak toksin oluşturarak intoksikasyon tipi hastalıklara yol açmaktadır. Stafilokokal intoksikasyon enterotoksijenik stafilokokların gıdalarda en az 10^5 kob/g bakteri sayısına yükseldikten sonra oluştuğu bilinmektedir. *S. aureus*'un ürettiği toksinler, A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H'den oluşmaktadır. *S. aureus* enterotoksin A (SEA) ve *S. aureus* enterotoksin B (SEB) toksinlerinin 120°C'de 30 dakikalık ısıl işlemle, *S. aureus* enterotoksin C (SEC) toksininin 120°C'de 60 dakikada tamamen inaktif olduğu bildirilmiştir[4].

Gıda örneklerindeki *S. aureus* sayısı, gıda işletmelerindeki yetersiz sanitasyon koşullarını göstergesi olarak düşünülebilir. Saptanan *S. aureus* sayısı ile enterotoksin bulunma olasılığı ile doğru orantılı olmakla beraber, bazı durumlarda düşük sayılarda bulunması, toksin bulunma oranını düşürmemektedir. Semptomlar, 1-6 saat sonra bulantı-kusma, karın ağrısı ile ortaya çıkmaktadır. Bir-iki gün içerisinde herhangi bir tedaviye gerek kalmadan iyileşir[5]. *S. aureus* türlerine insanların burun, ağız, el ve derilerinde normal flora üyeleri olarak sıkça rastlanır. En önemli kaynağı hijyen ve sanitasyon koşullarına uymayan gıda işçileridir. Bunun yanında, çiğ hayvansal ürünler de sorun yaratmaktadır[3].

Toplu beslenme hizmeti veren işletmelerde yapılacak en küçük bir hata bile çok fazla sayıda insanı etkileyerek, olumsuzluklara hatta ülkemizdeki turizm sektörüne darbeler vurabilmektedir. Burada asıl amaç, gıdalara *S. aureus*'un bulaşmasının önlenmesidir. Sonuç olarak, normal pişirme ve pastörizasyon normları, toksin inaktivasyonunu önlemede yeterli gelmemektedir.

Bu çalışmada, otel sektöründe sıcak yemek örneklerinde büyük önem arz eden *S. aureus*'lar enterotoksini varlığı ve tipini belirleyerek, tüketici sağlığı yönünden güvenilirliğini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Alınması ve Analize Hazırlanması

Araştırma 01.06.2015 - 01.10.2015 tarihleri arasında, Antalya çevresindeki turistik belgeli otellerde yapılmıştır. Herşey dâhil konseptiyle çalışan altı otel seçilmiş, her birinden farklı tarihlerde onar örnek, toplamda 60 sıcak yemek örneği mutfakta sunuya hazırlanırken alınmıştır.

Örnekler, 25 g'lık steril kaplarda alınarak, soğuk zincirde laboratuvara getirilmiş ve hemen analize

alınmıştır.

Gıda örnekleri, peptonlu su ile 1/10 oranında seyreltilerek homojenize edildikten sonra yumurta sarılı Baird-Parker Agar (Oxoid CM 275, Birleşik Krallık) petrilerine 0.1-0.5 ml. alınarak yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler 35-37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. *S. aureus*, 48 saat inkübasyon sonrasında yuvarlak, düzgün kenarlı konveks, gri/siyah renkli opak bir halka içinde ve etrafında şeffaf bir zon bulunan koloniler oluşturmuştur. Bu koloniler Gram boya ile boyanarak gram pozitif üzüm salkımı şeklinde koklar görülmüş ve yine katalaz testi uygulanmıştır[6,7].

"Dry Spot Staphtech Plus" kullanılarak (Oxoid DR 100M, Birleşik Krallık) koagülaz testi yapılmış, *S. aureus* kökenleri doğrulanmıştır. Daha sonra DNaz testi için, DNaz besiyerine spot ekimler yapılmış ve 37°C'de 24 saat geliştirilmiştir. Daha sonra üreyen koloninin üzerine 1N HCL asit damlatılmış ve petriler koyu zemin üzerinde incelenmiştir. Koloni etrafındaki açılmalar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Şüpheli koloniler, API Staph (bioMérieux's ref. 20500, ABD) ile test edilmiştir. Tüm bu tanımlama işlemlerinden sonra izole edilen mikroorganizma *S. aureus* olarak tanımlanmıştır[7-9].

Enterotoksin Analizi

Alınan sıcak yemek örneklerinde *S. aureus* enterotoksin analizi için kullanılmıştır. Enterotoksin analizi Reversed Passive Latex Agglutination ticari test kiti (Oxoid, SET RPLA, TD0900, Birleşik Krallık) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. On gram örnek alınmış, 10 ml. %0.85'lik sodyum klorür eklenerek homojenize edilmiştir. Hazırlanan homojenizat +4°C'de 30 dakika 9000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen homojenizatın supernatan kısmı alınmış ve mikro filtreler ile süzülmüştür. Her bir örnek için ELISA mikroplaklarına 25 µl seyreltme sıvısı (TD 910) eklenmiştir. Daha sonra birinci sütundaki her bir kuyucuğa bu süzüntüden 25 µl eklenmiş, yedinci kuyucuğa kadar 25 µl alınarak dilüe edilmiştir. Son kuyucuk yalnızca seyreltme sıvısı içermektedir. Dilusyon işlemi tamamlandıktan sonra her bir sıraya sırasıyla 25 µl enterotoksin A, B, C, D ve kontrol lateks reaktifleri eklenmiş ve yavaşça karıştırılıp üzeri kapatıldıktan sonra ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda mikrotitre plaklar siyah zemin üzerine konularak "Reversed Passive Latex Agglutination" test kiti kullanma kılavuzunda belirtilen şekillere göre değerlendirme yapılmıştır[8-10].

BULGULAR

Altmış adet yemek örneğinin 21'inde (%35) de *S. aureus* açısından bulaşık olduğu, bunların sayılarının sayısı $1.0x10^3$ - $4.7x10^4$ kob/g olduğu bulunmuştur. *S. aureus* sayısının $1.0x10^3$'den fazla olan 12 gıda örneğinin altısında enterotoksin pozitif bulunmuştur (Tablo 1). Birinci otelde bir adet SEB pozitif, ikinci otelde bir adet SEC pozitif, üçüncü otelde bir adet SEC pozitif, dördüncü otelde pozitif enterotoksin bulunamamış, beşinci otelde bir adet SEB pozitif, altıncı otelde ise bir adet SEA, bir adet SED pozitif olarak bulunmuştur. İncelenen 21 *S. aureus* bakterisinden SEA bir gıda örneğinde (%4.8), SEB iki gıda örneğinde (%9.4), SEC iki gıda örneğinde (%9.4) ve SED bir gıda örneğinde (%4.8) pozitif bulunmuştur.

Tablo 1. Enterotoksin saptanan yemek örneklerinde toplam *Staphylococcus aureus* sayısı.

Gıda Örneği	Toplam Bakteri Sayısı
G1	$3.4x10^3$
G2	$3.3x10^3$
G3	$4.7 x10^4$
G4	$1.0 x10^3$
G5	$4.5 x10^3$
G6	$2.0 x10^4$

Tablo 2. Gıda örneklerinde yapılan *Staphylococcus aureus* enterotoksin analizi sonuçları.

Enterotoksin Tipi	Otel 1 (N=10)	Otel 2 (N=10)	Otel 3 (N=10)	Otel 4 (N=10)	Otel 5 (N=10)	Otel 6 (N=10)
SEA	-	-	-	-	-	+
SEB	+	-	-	-	+	-
SEC	-	+	+	-	-	-
SED	-	-	-	-	-	+

+ pozitif; - negatif

Pozitif *S. aureus* enterotoksin analizleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda *S. aureus*'un toksin oluşturması koşullarının "Quorum Sensing" (QS) denilen bakterilerin yeterli hücre yoğunluğuna ulaşması ile ilgili olduğu belirlenmiştir. *S. aureus*'ların gıdada toksin oluşumuna fırsat verecek sayıya ($>10^5$ kob/g) ulaşmasından sonrası gıdaya uygulanan ısıl işlem, inhibitör madde ilavesi ya da su aktivitesini düşürmeye yönelik vb. işlemler etkisi ile sayının azalabileceği, buna rağmen bu tür uygulamaların mevcut toksinlerin varlığı üzerinde etkinin olmayacağı bilinmektedir[5,11].

Enterotoksijenik stafilokoklar sıklıkla toplu tüketim yapılan yerlerde tüketilen gıdalarda saptanmaktadır. Bunun nedeni ise pişmiş gıdalara, *S. aureus*'un sonradan bulaşma olasılığıdır. Ortamdaki rekabetçi flora, ısıl işlem ile ortadan kalktığı için *S. aureus*'un çoğalıp, toksin üretmesi için uygun ortam oluşmaktadır[8,11].

Yapılan birçok çalışmada, pişirilmiş yemeklerde stafilokokal enterotoksin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, ortamda gıda üretimin herhangi bir safhasında *S. aureus*'un üreyerek toksin üretebilecek ortamı bulduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir[12]. Diğer ülkelerde ve Türkiye'de enterotoksin varlığına yönelik çalışmalarda, Ferrer ve ark.[13] kafe ve restoranlardan temin edilen et, sebze, salata ve omlet örneklerinin %1.1'inde enterotoksijenik stafilokok saptamışlardır.

Kısa ve ark.[14]'nın 96 adet yaş pastayı inceledikleri bir çalışmada, 25'inden (%26) izole edilen koagülaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma yeteneğinde olduğunu saptamışlardır.

İtalya'da yapılan bir araştırmada, marketlerde satışa sunulan çeşitli gıdalardan izole edilen koagülaz pozitif *S. aureus* suşları identifiye edilmiştir. Aynı zamanda A, B, C ve D enterotoksinlerini belirlemişlerdir. Yapılan bu araştırmaya göre, 298 *S. aureus* suşunun %55.5'i bir ya da birden çok enterotoksin ürettiği, %33.9'u SEC, %26.5'i SEA, %20.5'i SEA+SED, %13.4'ü SED, %2.7'si SEB, %1.7'si SEA+SEB, %0.07'si SEC+SED, %0.3'ü SEA+SEC ve SEB+SEC enterotoksinlerini ürettikleri rapor edilmiştir[15].

Ankara'da tüketime sunulan 50 adet donmuş piliç karkası örneğinin 33'ünden (%66) ortalama $1.3x10^3$ kob/g düzeyinde koagülaz pozitif stafilokok saptanmıştır. Bunların yedisinin (%21.2) enterotoksin oluşturma yeteneğinde olduğu ve bu izolatların üçünün yalnızca A tipi enterotoksin, ikisinin yalnızca D tipi enterotoksin, birinin A ve B tipi enterotoksinleri birlikte, birinin de A, B ve C tipi enterotoksinleri birlikte oluşturduğu saptanmıştır[16].

İzmir'de açıkta satılan bazı peynir, kremalı pasta, kıyma ve tavuk etlerinde *S. aureus Staphylococcus* spp. ve aerobik mezofilik mikroorganizma sayıları incelenmiştir. Aerobik mezofilik sayısı $1.3x10^4$-$3.0x10^7$ kob/g, *Staphylococcus* spp. sayısı $<1.0x10^2$-$3.0x10^6$ kob/g ve *S. aureus* sayısı $<1.0x10^2$-$3.0x10^6$ kob/g arasında değişmiştir. Gıda örneklerinde

S. aureus'un A, B, C ve D enterotoksinleri de aranmış, fakat örneklerin hiçbirisinde enterotoksinlere rastlanılmamıştır[1].

Marmara bölgesinde incelenen höşmerim ve peynir helvası örneklerinde ortalama aerobik toplam bakteri $5.7x10^4$ kob/g, *S. aureus*, $8.0x10^2$ kob/g, küf $1.8x10^3$ kob/g, maya $2.8x10^3$ kob/g, ozmofilik maya $1.6x10^3$ kob/g olarak bulunmuş ve örneklerin hiç birinde stafilokokal enterotoksin bulunmamıştır[9].

Türk gıda kodeksi, "Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğe stafilokokların enterotoksinleri bütün gıda maddelerinde bulunmamalıdır." yönünde hüküm belirtilmiştir[17].

Bizim değerlerimiz ise, 60 yemek örneğinden 21'inde *S. aureus* bulunmuş, bunlardan SEA bir gıda örneğinde (%4.8), SEB iki gıda örneğinde (%9.4), SEC iki gıda örneğinde (%9.4), SED bir gıda örneğinde (%4.8) pozitif bulunmuştur. En çok enterotoksin B ve enterotoksin C'ye rastlanılmıştır.

Diğer çalışmalarla araştırma sonuçlarımız karşılaştırıldığında bazılarından yüksek, bazılarından ise düşük düzeyde kalmaktadır. Bunun nedeni araştırılan gıdaların farklı oluşu, yöntem farklılığı ve sanitasyon düzeylerindeki farklılıklar olabilir.

Tarladan çatala kadar uzanan kontaminasyon zincirinde stafilokoklar, taşıyıcılar vasıtasıyla başkaları için tehlike kaynağı olup, enterotoksinleri vasıtasıyla gıda intoksikasyonlarına neden olmaları nedeniyle bu bakterinin halk sağlığı açısından çok önemli yeri olduğu görülmektedir.

Staphylococcus aureus açısından oluşabilecek riski düşürmek için, gıdaların hazırlama, pişirme ve servisinde kişisel hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulması, çapraz bulaşmanın önlenmesi, personelin yeterli hijyen eğitimine sahip olması, gıdaların 5-65˚C sıcaklık aralığında gıdaların uzun süre bırakılmamasının sağlanması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Bilge F, Karaboz İ.** İzmir'de piyasada açıkta satışa sunulan bazı gıdaların *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinleri bakımından incelenmesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 2005:3:1-6.
2. **Carlquist NW, Marta D, Borch E, Radström P.** Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoksin A in processed pork meat. *Int J Food Microbiol* 2010; 141:69-74. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.028
3. **Çolak H, Ulusoy B, Bingöl B, Hampikyan H, Muratoğlu K.** Tüketime sunulan bazı hazır yemeklerin mikrobiyolojik kalitesinin incelenmesi. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37:225-33.
4. **Mutluer B, Kaymaz Ş, Erol İ, Akgün S.** Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşlarının beyaz peynirde üretim ve olgunlaşma sırasındaki üreme ve enterotoksin oluşturma yetenekleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1993; 40:413-26.
5. **Jay JM.** Staphylococcal gasteroenteritis, In: Modern Food Microbiology. 4th Edition, New York: Avi Book, 1992: 455- 471. https://doi.org/10.1007/978-94-011-6480-1_19
6. **Bennett RW, Lancette GA.** *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological Analytical Manuel (BAM), Food and Drug Administration (FDA), 2001. http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm (Erişim tarihi: Kasım 2016).
7. **Halkman K.** Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları 1. Baskı. Başak Matbaası, Ankara, 2005:181-282.
8. **Alişarlı M, Sağun E, Alemdar S, Akkaya L.** Kremalı pastalarda *Staphylococcus aureus* suşlarının gelişme ve enterotoksin oluşturma özellikleri üzerine etki yapan faktörler. *Turk J Vet Anim Sci* 2001; 26:535-42.
9. **Aydın A, Aksu H, Taşkanal N, Günsen U.** Microbiological, physico-chemical and toxicological quality of traditional Turkish cheese desserts. *J Food Qual* 2009; 32: 590-606. https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00271.x
10. **Ünlütürk A, Turantaş F.** *Staphylococcus aureus* intoksikasyonu: Gıda Mikrobiyolojisi, İzmir: Beta Matbaacılık Hizmetleri, 2003:141-45.
11. **Yılmaz S, Gönülalan Z.** Kayseri bölgesinde tüketime sunulan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması, *Saglik Bilim Derg* 2010; 19:26-33.
12. **Çakıcı N, Demirel-Zorba NN, Akçalı A.** Gıda endüstrisi çalışanları ve stafilokokal gıda zehirlenmeleri. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2015; 72:337-50. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.21704
13. **Ferrer MD, De simon D, Tarrago C.** Presence of microorganisms in prepared cooked foods. *Alimentaria* 1992; 229:69-70.

14. Kısa Ö, Albay A, Erol İ, ve ark. Kremalı pastalardan izole edilen koagulaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma özelliklerinin Vidas yöntemiyle belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1996; 43:405-11.

15. Normano G, Firunu A et al. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol* 2005; 98:73-9. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.008

16. Erol İ, Usca A. Donmuş piliç karkaslarından izole edilen koagülaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin SET-RPLA testi ile belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1996; 43:443-8.

17. Resmi Gazete. Türk gıda kodeksi-Mikrobiyolojik kriterler tebliği No: 24511/ 19, 2001.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(3):128-134, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.128

Araştırma

Antibiyotik Kontrol Ekibi Bakış Açısı ile Cerrahi Yara Enfeksiyonlarına Yaklaşım§

Nilay ÇÖPLÜ, Mustafa ÇAĞATAY, Nesibe AYGÜN ÜNAL, Şeyma SİNGER, Duygu ÖCAL
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Bölümü

ÖZET

Amaç: *Cerrahi yara enfeksiyonları için hastanemizde ameliyat öncesi profilaktik olarak sefazolin, yara enfeksiyonu geliştiğinde ise ampirik olarak gram pozitifler için teikoplanin veya vankomisin, Gram negatifler için piperasilin-tazobaktam başlanmakta, kültür ve antimikrobiyal duyarlılık test (ADT) sonucuna göre antimikrobiyal tedavi yeniden düzenlenmektedir. Bu çalışmada, ampirik tedaviye ve ADT sonucu çıktığında seçilecek öncelikli ilaçlara yol göstermek için veriler analiz edilmiştir.*

Gereç ve Yöntem: *Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.12.2014-31.12.2015 tarihleri arasında gönderilen yara kültürlerinin direkt Gram boyası incelenmiş, %5 koyun kanlı ve EMB agara ekilmiştir. İnkubasyon sonunda bakteriyel üreme, mikroskopi ve gerekirse klinikle iletişim sonucunda etken düşünüldüğünde tanımlama ve ADT için konvansiyonel yöntemler, Phoenix (BD Diagnostic Systems, ABD) otomatize sistemi, disk difuzyon ve gradient test (Liofilchem, İtalya) kullanılmıştır. ADT "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) kriterlerine göre çalışılmış ve raporlanmış, gerektiğinde "Clinical Laboratory Standards Institute" (CLSI) sınır değerlerinden yararlanılmıştır.*

Bulgular: *Poliklinik, servis ve yoğun bakımda sırasıyla 23, 44 ve 24 adet olacak şekilde toplam 91 adet suş izole edilmiştir. Enterobacteriaceae 50 (23'ü Escherichia coli), nonfermenter 29 (18'i Acinetobacter spp.), Staphylococcus spp. 25 (17'si Staphylococcus aureus) 5 Streptococcus spp. ve 2 Enterococcus spp. üremiştir. ADT sonuçları yine sırasıyla amikasin (%100) ve karbapenemler (%90); kolistin (%100), amikasin (%100) ve piperasilin-tazobaktam (%90); trimetoprim-sülfametoksazol (%100), vankomisin (%100), teikoplanin (%100), linezolid (%100), daptomisin (%100), klindamisin (%94) ve topikal olarak fusidik asit (%92) en duyarlı bulunan antimikrobiyaller olmuştur.*

Sonuç: *Bulgularımıza göre direkt bakıda gram negatif kok görülmesi hâlinde Acinetobacter spp için kolistin başlanması, basilse amikasin ya da karbapenemler, Gram pozitif koksa topikal olarak fusidik asit, sistemik olarak trimetoprim-sülfametoksazol veya klindamisin başlanması uygun olacaktır. Hastanemizin Gram negatifler için ampirik tedavi politikasının değiştirilmesi, Gram pozitifler için ise yüksek yüzde ile duyarlı bulunan A grubu ilaçlara öncelik verilmesi önerilir. Üreme sonrası gram özelliğine bakarak ampirik tedaviye devam edilebilir ya da kesilebilir, ADT sonuçları çıktığında duyarlı ise A grubu ilaçlarla değiştirmek, değilse B grubuna geçmek, zorunlu olmadıkça C grubu ilaçları kullanmamak yerinde bir tutum olacaktır.*

Anahtar kelimeler: *Antimikrobiyal direnç, cerrahi yara, antibiyotik kontrol ekibi*

SUMMARY

Approach to Surgical Wound Infections from the Perspective of Antibiotic Control Team

Objective: *In our hospital cefazolin is started before surgery in our hospital for prophylaxis of surgical wound infections. If wound infection develops then empirically teicoplanin or vancomycin for gram positive, and; piperacillin-tazobactam for gram negative bacteria are initiated. Antimicrobial therapy is readjusted according to the results of culture and antimicrobial susceptibility testing (AST). In this study the data were analyzed in order to guide the choice of drug for empirical therapy and after the results of AST were available.*

Material and Methods: *The wound culture materials sent to the microbiology laboratory between December 1st, 2014 and December 31st, 2015 were examined by direct Gram staining and inoculated onto EMB and 5% sheep blood agar media. After incubation, based on bacterial growth, microscopy results and- in case of need-direct communication with the clinics, agents decided to be a pathogen were identified and AST was performedusing Phoenix automated systems (BD Diagnostic Systems, USA), disk diffusion and gradient test (Liofilchem, Italy). AST was performed and reported according to the criteria of "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Standards" (EUCAST), and "Clinical Laboratory Standards Institute" (CLSI) cut-off points were used when needed.*

Results: *In total 91 strains were isolated from policlinics (n=23), clinics (n=44), and intensive care units (24). Fifty Enterobacteriaceae (23 Escherichia coli), 29 non-fermenters (18 Acinetobacter spp.), 25 Staphylococcus spp. (17 Staphylococcus aureus), 5 Streptococcus spp. and two Enterococcus spp. were isolated. The most effective antimicrobials were amikacin (100% susceptible), carbapenems (90%), colistin (100%), amikacin (100%) and piperacillin-tazobactam (90%); trimethoprim-sulphametoxazole (100%), vancomycin (100%), teicoplanin (100%), linezolid (100%), daptomycin (100%), clindamycin (94%) and topical fusidic acid (92%).*

Conclusion: *According to our data, we think that it would be suitable to start therapy as follows: colistin for gram negative cocci of Acinetobacter spp; amikacin or carbapenems for bacilli; topical fusidic acid, systemic trimethoprim/sulfamethoxazole or clindamycin for gram positive cocci. The empirical treatment policy in our hospital for gram negatives need to be changed since priority is recommended to be given to group A drugs which were found to be highly effective for gram positives. After pathogenic bacteria are identified,, empirical treatment may be continued or stopped according to the gram staining characteristics of bacteria. After AST results are available it will be appropriate to switch to effective group A antibiotics, if they are not effective then group B antibiotics should be chosen. Group C antibiotics should be avoided unless necessary.*

Key words: *antimicrobial resistance, surgical wound, antibiotic control team*

Alındığı tarih: 08.08.2016
Kabul tarihi: 28.11.2016
Yazışma adresi: Nilay Çöplü, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, İrfan Baştuğ Cad. Dışkapı, Altındağ / Ankara
Tel: (0312) 596 26 70 **Faks:** (0312) 318 66 90
e-posta: nilaycoplu@gmail.com
§ Çalışma, XII. Antimikrobik Kemotarepi Günleri (01-03 Nisan 2016, Askeri Müze, Harbiye, İstanbul) Sempozyumu'nda sunulmuştur

GİRİŞ

Antimikrobiyal direnç tüm dünyada ve ülkemizde hızla artmaktadır ve bununla savaşmak için gereken önlemlerin hızla alınması gereklidir[1]. Bu önlemlerden birisi hastanelerde antibiyotik kontrol ekibinin kurulmasıdır[2,3]. Bu ekipte çalışan mikrobiyoloğun görevleri arasında standartlara uygun, hızlı, doğru tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT) yapmak, ADT sonucunu kısıtlı ve yorumlu rapor vermek, hastaneye özgü antimikrobiyal direnç surveyansı (ADS) yapmak, ADS sonuçlarını irdeleyerek ampirik tedaviye yol göstermek ve antimikrobiyal kullanım politikaları geliştirmeye katkı vermektir[1-6]. Direnç gelişimi ile savaş amacıyla antimikrobiyal ilaçlar "Clinical Laboratory Standards Institute" (CLSI) tarafından etkenlere göre özgül test ve bildirim gruplarına alınmıştır[4]. Bu gruplandırma ana hatlarıyla A, B, C ve U şeklinde olup, antimikrobiyallerin klinik etkinlikleri, direnç sıklığı, direnç çıkışının en aza indirilmesi, fiyat, klinik kullanım endikasyonları, ilk seçenek ve alternatif ilaçlar için uzlaşılan önerilere göre yapılmıştır. Ülkemizde 2015 yılından bu yana pek çok laboratuvar "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) standartlarını kullanmaya başlamıştır. EUCAST henüz kısıtlı bildirim gruplandırma çalışması yapmamış, bu konuyu ülkelerin ulusal antibiyotik komitelerine bırakmıştır. Türkiye'de "Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antimikrobik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu" çalışma grubu, ülkemizde bulunmayan ilaçları da gözeterek gruplandırma çalışması yapmış ve yayımlamıştır[7,8]. ADT raporlandırması bu ilkeler doğrultusunda kısıtlı ve yorumlu olarak yapılmalıdır. Bir diğer görev hastaneye özgü direnç surveyansı olup yıllık yapılması gereken bir mevcut durum analizdir. Bu analizde bakteri cins ve türüne özgü direnç yüzdelerinin yanı sıra vücut bölgesi ya da klinik örneğe, hastanın bulunduğu yere (poliklinik, servis, yoğun bakım, yanık ünitesi gibi) ve belli direnç özelliklerine (Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* "MRSA" gibi) göre direnç dağılımını da belirlemek ampirik tedavide yol gösterici olacaktır[6]. Antibiyotik kontrol ekibi ADT sonucu çıktığında da kısıtlı ve yorumlu bildirim kuralları ile direnç surveyans verilerini beraber değerlendirilerek, antibiyotik kullanım politikalarını katkıda bulunmalıdır.

Hastanemizde cerrahi yara enfeksiyonları için alınan önlemler şöyledir: Profilaksi için sefazolin (CZ), enfeksiyon geliştiğinde ampirik tedavi için Gram negatiflere yönelik piperasilin-tazobaktam (TZP), Gram pozitiflere yönelik vankomisin (VA) ya da teikoplanin (TEC) başlanmakta ve ADT sonuçları çıktığında gereken değişiklik yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ADS verileri ile uygulanmakta olan politikaları karşılaştırarak uygun yanları ve varsa iyileştirme gereken konuları saptamaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.12.2014-31.12.2015 tarihleri arasında gönderilen yara kültür örneklerinin direkt Gram boyası incelenmiştir. Bu inceleme sırasında Q skoru ve bakterinin Gram boyama özellikleri ile morfolojisi değerlendirilmiştir. EMB ve %5 koyun kanlı agara ekilmiştir. Gerekli durumlarda 48 saate kadar uzatılan inkubasyon sonunda gelişen bakteriyel üremenin etken olup olmadığına, mikroskopi bulguları ve gerekirse klinikle iletişim ile beraber değerlendirerek karar verilmiştir. Etken olduğu düşünüldüğünde tanımlama ve ADT için konvansiyonel yöntemler, Phoenix (BD Diagnostic Systems, ABD) otomatize sistemi, disk difuzyon ve gradient test (Liofilchem, İtalya) kullanılmıştır. ADT, EUCAST kriterlerine göre çalışılmış ve raporlanmış, gerektiğinde CLSI sınır değerlerinden yararlanılmıştır[4,7,9,10].

BULGULAR

Toplam 91 adet suş izole edilmiştir. Bölümler Anestezi ve Reanimasyon, Beyin Cerrahi, Genel Cerrahi, Kalp Damar Cerrahisi, KBB, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi ve Üroloji olup, Poliklinik, Servis ve Yoğun Bakım için sırasıyla 23, 44 ve 24 adet izolat üremiştir. *Enterobacteriaceae* 50 (23'ü *Escherichia coli*); non-fermenterler 29 (18'i *Acinetobacter* spp.); 25 *Staphylococcus* spp (17'si *S. aureus*); 5 *Streptococcus* spp. ve 2 *Enterococcus* spp üremiştir. İzolatların tümüne ADT uygulanmış olup, sonuçları Tablo 1, 2a, 2b ve 3'te sunulmaktadır.

Tablo 1. *Enterobacteriaceae* (n=50) duyarlılık yüzdeleri.

Antimikrobiyal	Ampisilin[2]	Gentamisin[2]	Sefuroksim[2]	Amoksisilin-Klavulanik asit[3]	Piperasilin-Tazobaktam[3]	Seftazidim[3]	Amikasin[3] (AK)	Siprofloksasin[3]	Levofloksasin[3]	Trimethoprim/sulfamethoksazole[3]	Ertapenem[4]	Sefepim[4]
Eesherichia coli (n=23)	7	73	29	13	50	20	100	41	63	30	90	47
Tümü[1]	3	72	22	7	66	57	100	57	72	38	76	57

[1]Enterobacter spp. 8; Klebsiella spp. 9; Proteus spp. 7; Morganella morganii; [2] Serratia marcescens 1 suş; [2]A grubu öncelikli antimikrobiyaller;
[3] B grubu kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller;
[4] C grubu son seçenek, kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller

Tablo 2a. Non fermenterler: *Acinetobacter* spp (n=18) duyarlılık yüzdeleri.

Antimikrobiyal	Ampisilin-Sulbaktam[1]	Seftazidim[1]	İmipenem[2]	Meropenem[2]	Gentamisin[2]	Amikasin[2]	Siprofloksasin[2]	Piperasilin-Tazobaktam[3]	Trimethoprim/sulfamethoksazole[3]	Netilmisin[3]	Kolistin[3]	Tigesiklin[3,4]
Acinetobacter spp[1]	0	10	5	0	5	5	0	11	28	0	100	33

[1] A grubu öncelikli antimikrobiyaller
[2] B grubu kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller
[3] C grubu son seçenek, kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller
[4] Üç adet suşta çalışılmıştır.

Tablo 2b. Non fermenterler: *Pseudomonas* spp. (n=11) duyarlılık yüzdeleri.

Antimikrobiyal	Seftazidim[2]	Gentamisin[2]	Piperasilin-Tazobaktam[2]	Amikasin[4]	İmipenem[4]	Meropenem[4]	Sefepim[4]	Siprofloksasin[3]	Kolistin[4]
Pseudomonas spp[1]	80	80	90	100	80	78	78	70	71

[1] Pseudomonas aeruginosa 7 (suş)
[2] A grubu öncelikli antimikrobiyaller
[3] B grubu kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller
[4] C grubu son seçenek, kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller

TARTIŞMA

CZ cerrahi profilaksi için önerilen bir ilaçtır ve bu nedenle cerrahi profilakside uygun bir seçimdir[11,12].

Enfeksiyon gelişmesi durumunda, kültür örneği alınır alınmaz duyarlı bulunma olasılığı yüksek bir antimikrobiyal ile ampirik tedaviye başlanmakta, kültür ve antibiyogram sonuçları çıktığında daraltma (de-eskalasyon) yapılmaktadır. Seçilen ampirik antibiyotiklerin uygunluğu hastanemizin verilerine bakarak irdelendiğinde, basil formunda olan Gram negatif bakterilerde duyarlılık yüzdelerine bakıldığında, ampirik tedavide seçilen TZP'nin *Pseudomonas* spp için %90, *Enterobacteriaceae* için %66, hatta en sık izole edilen etken olan *E. coli* için %50 duyarlı olduğu görülmektedir (Tablo 1, Tablo 2b). Bu durumda mikrobiyoloğun koloni morfolojisi ve oksidaz testi ile *Pseudomonas* spp. düşündüğü durumlarda bunu ön tanı olarak rapor etmesi, TZP'nin ampirik tedavide devam edilmesine olanak tanıyacaktır. Öte yandan, eğer nonfermenter düşünülmüyor ve hatta koloni morfolojisinden *E. coli* ön tanısı konulabiliyorsa TZP uygun seçim olmayacaktır. Buna karşılık koloni morfolojisinin yol gösterici olabilmesi için de en az bir gecelik inkubasyonun gerekli olduğu düşünülürse, Gram negatiflere yönelik ampirik tedavide ortak duyarlı bir ilaca gereksinim olduğu görülmektedir. Bu bakış açısıyla irdelendiğinde, amikasin (AN) hem *Enterobacteriaceae* hem de *Pseudomonas* spp.'de %100 duyarlı bulunmuştur, ancak yan etkileri ve gebelik gibi bazı durumlarda kullanımının kısıtlı olması başka seçeneklere de yönelmeyi gerekli kılabilir. Böyle durumlar için alternatif ilacın her ne kadar C grubunda olsa da karbapenemler olabileceği görülmektedir. Gram negatif bakterilerden *Acinetobacter* spp için ise kolistin (CL) dışında hiçbir antimikrobiyalin ampirik tedaviye uygun olmadığı, hatta AST sonuçları çıktıktan sonra bile sıklıkla başka seçenek kalmadığı görülmektedir (Tablo 2a). Buna karşılık CL yan etkileri çok fazla olan ve C grubu ilaçlar arasındadır. Bu nedenle, klinik örnekten yapılan Gram boyama bulguları ivedilikle bildirilmeli, ek olarak üremenin saptandığı ilk gün yeniden Gram boyama yaparak hem Gram boyanma özelliği hem de morfolojik yapısının kok ya da basil olduğu klinisyene bildirilmelidir. Bu sayede Gram negatif basil görülmesi hâlinde eğer CL başlandıysa kesilme şansı doğacaktır.

Gram pozitifler için VA ve TEC %100 duyarlılık göstererek yanlış seçim olmadığı görülmektedir. Buna karşılık öncelikli ilaç gruplandırma bakış açısıyla bakıldığında ve Tablo 3'ün dipnotlarından da anlaşılacağı üzere VA ve TEC son seçenek ilaçlar olup bildirimi ve dolayısı ile kullanımı kısıtlandırılması gereken ilaçlardır. Bu ilaçlar özellikle MRSA'da son seçenek olabilen ilaçlar olup, direnç gelişimi ile savaşılması gerek-

Tablo 3. *Staphylococcus* spp (n= 25) duyarlılık yüzdeleri.

Antimikrobiyal	Benzil penisilin[2]	Metisilin[2]	Eritromisin[2]	Trimetoprim-Sülfametoksazol[2]	Vankomisin[3]	Teikoplanin[3]	Tetrasiklin[3]	Levofloksasin[3]	Siprofloksasin[3]	Linezolid[4]	Daptomisin[4]	Fusidik asit[4]
Staphylococcus aureus	0	87	71	71	100	100	75	93	75	100	100	92
Tümü[1]	0	74	60	60	100	100	71	82	75	100	100	74

[1] Staphylococcus spp., koagülaz negatif stafilokoklar dört (Staphylococcus epidermidis iki, Staphylococcus lentus bir, Staphylococcus lugdunensis bir) adet,
[2] A grubu öncelikli antimikrobiyaller
[3] B grubu kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller
[4] C grubu son seçenek, kısıtlanması gerekebilen antimikrobiyaller

mektedir[7,8]. Oysa A grubunda olup, ilk seçenek ilaçlardan olan trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SXT) %100 duyarlı bulunmuş, ek olarak C grubundan olmasına karşılık yara için topikal kullanıma uygun olan fusidik asit (FA) %92 duyarlılık göstermiştir. Bu iki ilacın hem ampirik tedavi hem de direnç gelişimiyle savaşta uygun seçenekler oldukları gözlenmektedir.

De-eskalasyon için normal koşullarda ADT sonuçları beklenmektedir. Buna karşılık, eğer mikrobiyoloji laboratuvarı üremenin görüldüğü ilk gün ön tanı rapor ederse, ADT çıkmadığı halde, üremenin gram özelliği ile bir gün erken de eskalasyon yapılabilir. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının üreme görülen ilk gün Gram boyanma özelliği, katalaz reaksiyonu, koagülaz testi, L-pirolidonil-β-naftilamid (PYR) hidrolizi ve oksidaz testi gibi birkaç hızlı test ile ön tanımlama rapor etmelerinde yarar vardır. Bu çalışmanın verilerine göre, ampirik tedavi verilmiş hasta örneklerinden Gram pozitif üreme gösteren 32 suş için Gram negatif bakterilere yönelik başlanan antimikrobiyaller bir gün erken kesilebilir. Bu da bu çalışmanın kapsadığı dönemde 32 tanımlanmış günlük doz (TGD) TZP'nin eksik verilmesi anlamına gelmektedir. Benzer şekilde 59 Gram negatif bakteri üremesi için de VA ya da TEC için 59 TGD eksik verilebilecektir. Bilindiği gibi antimikrobiyal ne kadar az kullanılırsa direnç gelişimi o kadar azalacak, ek olarak hastaya biyolojik yük ve ekonomiye kayıp da azaltılmış olacaktır[1]. Öte yandan bu uygulamaya geçildiğinde klinisyenler haberdar edilmeli ve eskalasyon yapabilecekleri belirtilmelidir.

ADT sonuçları çıktığında, yine kısıtlı ve yorumlu raporlandırma kriterleri kullanılmalı, hastane verileri de bu aşamada dikkate alınmalıdır. Eğer direnç artışı gösteren bir antimikrobiyal varsa öncelikli grupta olsa dahi duyarlı bulunduğunda zorunlu hâller dışında rapor etmeyerek, kullanımının azaltılmasına çalışılmalıdır. Bilindiği gibi kullanımın azalması zaman içinde direncin de azalması ile sonuçlanmaktadır[13]. Klinisyenlerle ortak yapılacak bir eğitim saatinde antimikrobiyal kullanımında önceliklendirme ve gruplandırma mantığının anlatılması ve tartışılmasında yarar vardır. Kendi hastanemizin bulgularına bakıldığında *Staphylococus* spp. için metisilin duyarlılığı %74, hatta *S. aureus* için %87 bulunmuştur. Bu durumda beta laktam-beta laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar yararlı olabilecektir ve yalnızca A grubu ilaçların rapor edilmesi, diğer gruplardan varsa dirençlilerin rapor edilip, duyarlıların bildirilmemesi uygun bir adım olacaktır. Bunu yaparken penisilin dirençli metisilin duyarlı suşlarda hangi antimikrobiyallerin kullanılabileceğini rapora dip not olarak eklemekte yarar vardır. Gram negatif bakterilerde *Enterobacteriaceae* verileri, sıklıkla ikinci grup ilaçların da rapor edilmesi gerekebileceğini gösterirken, *Pseudomonas* spp. için ilk grubun genellikle yetebileceğini işaret etmektedir. *Acinetobacter* spp. ise ülkemizde pek çok hastanede olduğu gibi CL dışında çok az antimikrobiyale duyarlı bulunmakta ve ne yazık ki fazla seçenek bırakmamaktadır.

Bu çalışmanın bulgularını 2008-2012 yılları arasında yapılmış benzer çalışmalarla karşılaştırdığımızda duyarlılık yüzdelerinin, *S. aureus* için metisilin 73-82, florokinolonlar 70-80, linezolid (LZ) 93, FA 96, eritromisin 23-85, klindamisn (CC) 60-90, TMP/SXT 89, VA ve TEC 100 ve 100; *E. coli* için aminopenisilinler 0-66, 3. kuşak sefalosporinler 22-39, gentamisin (GN) 46-68, amikasin (AK) 58-89, florokinolonlar 45-63, karbapenemler 95-100; *Acinetobacter* spp. için aminoglikozidler 7-67, florokinolonlar 4-46, karbapenemler 16-96, seftazidim (CAZ) 10-28, TZP 35-46, TMP-SXT 2-47, CL 97, tigesiklin 90; *Pseudomonas aeruginosa* için GN 80-86, AN 79-92, florokinolonlar 58-83, CAZ 63-87, sefepim 64-84, TZP 87 ve karbapenemler 69-100 arasında değiştiği görülmüştür[14-16]. Diğer çalışmalarda *Acinetobacter* spp. dışındaki bulgular,

bu çalışmanın bulguları ile benzerlik göstermektedir. *Acinetobacter* spp. için duyarlılığın genelde daha yüksek olması bu bakterinin son yıllarda hızla artan direnç göstermesi ve diğer çalışmaların daha eski olması ile açıklanabilir. Sonuç olarak, 2000 yılında yapılmış olan bir başka çalışmada, çok daha düşük direnç yüzdeleri görülmüştür[17].

"Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance" (CEASERS) kan ve beyin-omurilik sıvısında etken olan invazif izolatların direnç verilerini toplamaktadır[18]. CEARSER 2014 raporunda Belarus, İsviçre, Makedonya, Türkiye ve Sırbistan'ın verileri sunulmuştur. Coğrafi yakınlık nedeni ile bu surveyans raporunda sunulan etken ve antimikrobiyal ajanların sonuçları çalışmamızla karşılaştırılmıştır. Duyarlılık yüzdelerinin *E. coli* için aminopenisilinler 6-51, 3. kuşak sefalosporinler 13-82, aminoglikozidler 42-82, florokinolonlar 71-83, karbapenemler 0-5, *Acinetobacter* spp. için aminoglikozidler 9-90, florokinolonlar 9-89, karbapenemler 7-89, *P. aeruginosa* için aminoglikozidler 49-95, AN 60-99, florokinolonlar 53-90, CAZ 56-94 ve karbapenemler 52-90, *S. aureus* için metisilin 58-95, florokinolonlar 67-92, LZ 98-100 arasında değiştiği görülmüştür. Verilerimizle karşılaştırdığımızda, *Acinetobacter* spp. için bizim duyarlılık yüzdelerimizin daha düşük olduğu, diğer yüzdelerin ise değerlerimizi içerdiği gözlenmiştir.

Antibiyotik kontrol ekibinde çalışan mikrobiyoloji uzmanı, antibiyotik kullanımını azaltmak, kullanılması gereken durumlarda da direnç gelişimini en aza indirecek politikalar geliştirmek amacıyla hem laboratuvarda gereken düzenlemeleri yapmalı,hem de klinisyenlerle iletişim içinde olmalıdır. Bu çalışmada, söz konusu bakış açısı ile cerrahi yara enfeksiyonlarında ampirik tedavi ve profilakside seçilebilecek ilaçlar mevcut durum ile karşılaştırılmış, ADT sonucu çıktıktan sonra seçilecek öncelikli ilaçlarla ilgili nasıl bir yol izlenmesi gerektiği hakkında önerilerde bulunulmuştur.

Teşekkür

Mikrobiyoloji Bölümü Kültür Laboratuvarı'nda çalışarak bu bulguların elde edilmesinde emeği geçen Enes Altunay, Gizem Türkoğlu, Gül Bahar Erdem, Halime Özdemir, Mehmet Erdal, Mesut Bulut, Nalan Apaydın, Oğuz Alp Gürbüz, Ömer Miroğlu, Saime Baylav, Semra Kavas, Semra Tayfur, Yusuf Avşar, Zeynep Dansuk, Zübeyde Lale'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O'Neill, May 2016. http://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf (Erişim tarihi: Kasım 2016).
2. Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs. http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare/implementation/core-elements.html (Erişim tarihi: Kasım 2016).
3. The Scottish Management of Antimicrobial Resistance Action Plan [ScotMARAP] 2008. 11. Action Plan: Antimicrobial Management Teams (AMT) http://www.gov.scot/Publications/2008/03/12153030/11 (Erişim tarihi: Kasım 2016).
4. **CLSI.** Clinical and Laboratory Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Fifth Informational Supplement. Document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
5. **Paterson DL.** The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals. *Clin Infect Dis* 2006; 42 Suppl2:S90-5. https://doi.org/10.1086/499407
6. **CLSI.** Clinical and Laboratory Institute. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test sata, Approved Guideline, Fourth Edition, Document M39-A4, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
7. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti EUCAST Dökümanları. http://www.tmc-online.org/?action=sayfa&id =29 (Erişim tarihi: Kasım 2016).
8. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, ADTS Çalışma Grubu.** Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2016; 46 Ek:E1-206.
9. Deri, Deri ekleri, Yumuşak Doku Örnekleri-Göz Örnekleri. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları İçin Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi. KLİMUD Kaynak No 8. Kasım 2015, Ankara, 2015.
10. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları / Bulaşıcı Hastalıklar

Laboratuvar Tanı Rehberi. Cilt II. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara, 2014.

11. **Bratzler DW, Houck PM, Surgical Infection Prevention Guideline Writers Workgroup.** Antimicrobial prophylaxis for surgery: An advisory statement from the National Surgical Infection Prevention Project. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1706-15. https://doi.org/10.1086/421095
12. **Mujagic E, Zwimpfer T, Marti,WR, et al.** Evaluating the optimal timing of surgical antimicrobial prophylaxis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2014;15:188. https://doi.org/10.1186/1745-6215-15-188
13. **Karaca Y, Coplu N, Gozalan A, Oncul O, Citil BE, Esen B.** Co-trimoxazole and quinolone resistance in Escherichia coli isolated from urinary tract infections over the last 10 years. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26,75-7. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.03.012
14. **Doğan SŞ, Paköz NİE, Aral M.** Laboratuvarımıza gönderilen yara yeri örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere direnç durumları. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2010; 40:243-9.
15. Seni J, Najjuka CF, Kateete DP, et al. Antimicrobial resistance in hospitalized surgical patients: a silently emerging public health concern in Uganda. *BMC Res Notes* 2013; 6:298. https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-298
16. **Giacometti A, Cirioni O, Schimizzi AM, et al.** Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *J Clin Microbiol* 2000; 38:918-22.
17. **Cirit OS, Müderris T, Uzala Mızraklı A, Vurupalmaz Y, Barış A.** Yara kültürlerinden izole edilen aerop bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2014; 44:149-57.
18. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CEASERS) 2014 Annual Report. World Health Organisation, Regional Office for Europe. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/285405/CAESAR-Surveillance-Antimicrobial-Resistance2014.pdf?ua=1 (Erişim tarihi: Kasım 2016).

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(3):135-140, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.135

Araştırma

Lamivudin Tedavisi Alan Kronik Hepatit B Hastalarında Direnç Mutasyonlarının Moleküler Yöntem ile Belirlenmesi

Sevin KIRDAR*, Mehmet Hadi YAŞA, Neriman AYDIN*, Berna GÜLTEKİN KORKMAZGİL***

** Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,*

*** Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı*

ÖZET

Amaç: *Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu önemli bir sağlık sorunu olup, tüm dünyada morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir. Bu virüsün neden olduğu enfeksiyonun kronikleşmesi karaciğerde fibrozis, siroz ve kansere yol açabilmektedir. Kronik hepatit B tedavisinde kullanılan antivirallere karşı gelişen dirençte yıllar içinde artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda, multipleks PCR ve ters hibridizasyon yöntemi ile lamivudin (LAM) tedavisi alan kronik hepatit B hastalarında ilaç direnci mutasyonlarının sıklığı ve mutant suş tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Bu çalışma prospektif, tanımlayıcı temelde gerçekleştirilen epidemiyolojik bir çalışmadır. Çalışmaya Mayıs 2007-Ocak 2012 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'nde kronik hepatit B (KHB) tanısıyla izlenen ve bir yıl süre ile LAM kullanan 50 hasta alınmıştır. Bütün örnekler HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total, HBeAg, AntiHBe göstergelerini belirlemek için kemilüminesan immünolojik yöntem ile Architect otoanalizöründe çalışılmıştır. Serum örneklerinden HBV DNA izolasyonu ticari bir kit (Roche Diagnostic, Almanya) ile üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır. HBV DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemi (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, Roche, ABD) ile belirlenmiştir. HBV'ünde LAM direncine neden olan mutasyonlar multipleks PCR ve ters hibridizasyon yöntemi ile araştırılmıştır.*

Bulgular: *Çalışmamızda bir yıl lamivudin tedavisi almış, kronik B hepatitli 50 hastanın 12'sinde (%24) primer ve kompensatuvar (onarıcı) mutasyonlar belirlenmiştir. Mutasyon saptanan hastalardan altısında (%50) LAM direnci (rtM204I, YIDD motifi) tek başına, dördünde (%33.3) LAM ve ADV direnci birlikte ve iki hastada 20 (%16.7) LAM ve ADV direnci ile kompensatuvar mutasyonlar saptanmıştır.*

Sonuç: *Çalışmamızda, en sık rtM204I ve rtL180 mutasyonları belirlenmiştir. Aydın ilinde lamivudin kullanan kronik hepatit B hastalarında, LAM direnci ülkemizde yapılan önceki çalışmalardakine benzer oranda bulunmuştur.*

Anahtar kelimeler: *Direnç, hepatit B virus, lamivudin, mutasyon*

SUMMARY

Detection of Resistance Mutations Using Molecular Method in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Lamivudine Therapy

Objective: *Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem and major cause of morbidity and mortality worldwide. Chronic HBV infection leads to cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma. Increased resistance to antivirals that are used to treat chronic hepatitis B is observed over the years. In this study, we aimed to determine the frequency of lamivudine (LAM) resistance seen in chronic hepatitis B patients and the mutant profiles using multiplex PCR and reverse hybridization methods.*

Material and Methods: *This prospective, descriptive study was conducted between May 2007 and January 2012. A total of 50 subjects that were followed-up for chronic hepatitis B and receiving LAM therapy for at least one year at the Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Outpatient Clinics of Gastroenterology Unit were included in this study. Markers of HBsAg/anti-HBs, hepatitis B e antigen (HBeAg)/anti-HBe, and anti-HBc were studied using the Architect instrument Assay. The isolation of nucleic acid from serum samples was performed using a commercial kit (Roche Diagnostic, Germany) according to the manufacturer's instructions. HBV-DNA levels were determined using a commercial real-time polymerase chain reaction method (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, Roche, USA). Mutations of LAM resistance was determined by multiplex PCR and reverse hibridization method.*

Results: *Primary and compensatory mutants were detected in 12 patients (24%) who had been using lamivudine for one year. Six of 12 (50%) patients were found to be resistant to LAM (rtM204I, YIDD motif) or LAM and ADV (n=4; 33.3%). In 2 (16.7%). patients, resistance to LAM+ADV together with compensatory mutations were detected.*

Conclusion: *The most commonly detected mutations are rtM204I and rtL180 mutations. Lamivudine resistance in chronic hepatitis B patients in our locality of Aydın province is similar to the results of other studies in our country.*

Key words: *Resistance, Hepatit B virus, lamivudine, mutation*

Alındığı tarih: 11.11.2016
Kabul tarihi: 08.12.2016
Yazışma adresi: Sevin Kırdar, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın
e-posta: sevikirdar@yahoo.com

GİRİŞ

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu tüm dünyada morbidite ve mortalite açısından önemli bir sağlık sorunudur[1]. Bu virüsün neden olduğu enfeksiyonun kronikleşmesi fibrozis, siroz ve karaciğer kanserine yol açabilmektedir[2]. Kronik hepatitlerde tedavi kararı, hangi tedavinin uygulanacağı ve tedavi sonrası izlem önem taşır. Hepatit B virüsünde görülen mutasyonlar hem tedavi kararını etkiler hem de tedaviye yanıtı değiştirir[3]. Günümüzde kronik HBV enfeksiyonun tedavisinde kullanılan ilaçlar immün modülatörler (alfa interferon ve pegillenmiş formları) ve antiviral ilaçlardır. Antiviral ilaçlar, nükleozid ve nükleotid analoglarından oluşurlar ve günümüzde bunlar arasından lamivudin [LAM], adefovir [ADV], entekavir [ETV], tenofovir [TDF] ve telbuvidin [LdT]) tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır[4].

Kronik hepatit B tedavisinde antiviral ilaçların kullanıma girmesi ile bu ilaçlara karşı gelişen direnç mutasyonları bildirilmeye başlanmış ve yıllar içinde direnç sıklığında artış gözlenmiştir. Antiviral ilaç direnci HBV'nin polimeraz revers transkriptaz (rt) bölgesinde oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır[5].

Lamivudin etkinliği, güvenirliği ve maliyeti gibi nedenlerle kronik hepatit B tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan antiviraldir[6]. Lamivudinin HBV'ye karşı kuvvetli ve hızlı gelişen antiviral etkisinin yanı sıra ciddi yan etkilerinin olmaması ve kullanım kolaylığı yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur[7]. LAM için yanıt kaybı ve histolojik progresyon ile sonuçlanan direnç gelişimi en önemli sorunlardan birisidir. Bu nedenle uzun süreli lamivudin tedavisi sırasında ortaya çıkabilecek primer ve kompansatuvar mutasyonların belirlenmesi önemlidir[6]. Lamivudin direncine yol açan mutasyonlar, genellikle revers transkriptazın C bölgesinde yer alan YMDD (Y: tirozin, M: metiyonin, D: aspartik asit, D:aspartik asit) motifindedir. YMDD mutasyonlu olgularda metiyonin (M) yerine valin (V) (M204V dizayn olarak YVDD) ve/veya izolösin (I) (M204I dizayn olarak YIDD) ile yer değiştirmiş şekilde görülür[8,9]. Hepatit B tedavisinde kullanılan lamivudine yanıt vermeyen hastalarda en sık görülen mutasyon, revers transkriptaz enziminin 204 no.lu kodonunda görülen rtM204V/I (YMDD) mutasyonudur. rtM204V/I mutasyonu ile birlikte kompansatuvar rtL180M ve rtA181T mutasyonları oluşabilir. Bu kompansatuvar mutasyonlardan rtA181T, ADV kullanımı sırasında da ortaya çıkabilir. Lamivudin dirençli suşlarda kompansatuvar olarak rtV173L ve rtL80V/I değişiklikleri de görülebilmektedir[5].

Lamivudin tedavisi alan hastalarda YMDD mutasyon oranları tedavinin birinci yılında yaklaşık %23 iken, tedavinin 4-5. yıllarından sonraki oranlar ise %70-80'leri bulmaktadır[10]. Mutasyonların erken belirlenmesi, klinik değişiklikleri anlamak ve tedavi değişikliklerini hızlandırmak için gereklidir[11].

Günümüzde HBV antiviral ilaç direncini belirlemede kullanılan genotipik yöntemler arasında dizi analizi, PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ve ters hibridizasyon (Line probe, Lipa DR) yöntemi bulunmaktadır[12,13]. Antiviral direnci belirlemede doğrudan dizi analizi ile ters hibridizasyon yöntemleri en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Dizi analizinin en önemli dezavantajı, tüm HBV populasyonunda %30'dan az oranda görülen minör türleri saptamada yetersiz kalmasıdır. Ters hibridizasyon yöntemi, viral populasyonda %5 kadar az oranda ortaya çıkan mutantları saptayabilen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test olup, dezavantajı yalnızca bilinen mutasyonları saptayabilmesidir[14].

Çalışmamızda lamivudin tedavisi alan kronik Hepatit B hastalarında ilaç direnci mutasyonları-

nın sıklığı ve dirençten sorumlu olan mutant suş tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma prospektif, tanımlayıcı temelde gerçekleştirilen epidemiyolojik bir çalışmadır. Çalışmaya Mayıs 2007-Ocak 2012 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvurmuş, kronik hepatit B tanısı almış 50 hasta dâhil edildi. Çalışmada yer alan 50 hastanın 32'si (%64) erkek, 18'i (%36) kadın olup, yaş ortalaması 46.90±13.14 (yaş aralığı: 21-77 yıl) yıldır. Hastaların tamamı bir yıl süre ile LAM kullanmış hastalardan oluşmaktaydı. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Birimi'nce desteklendi (Proje No:060018) ve Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul'undan onay alındı (protokol no: 2006/123). Hastalardan alınan kan örneklerinden santrifüj sonrası ayrılan serumları çalışma zamanına kadar -80°C'de saklandı.

HBV serolojisi (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total, HBeAg, AntiHBe) kemilüminesan immünolojik yöntem ile Architect otoanalizöründe (Abbott, Almanya) çalışıldı. Serum örneklerinden 200 μl kullanılarak High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostic, Almanya) ile üretici firma önerileri doğrultusunda nükleik asit izolasyonu yapıldı ve HBV DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, HBV test, version 2.0, Roche, ABD) yöntemi (saptama aralıkları: 20 IU/ml-20x107 IU/ml) ile belirlendi.

Lamivudin direnç mutasyonlarını belirlemek için hasta serumlarından HBV DNA izolasyonu QIAamp viral DNA mini izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. Lamivudine karşı gelişen genotipik direnç ters hibridizasyon yöntemi esaslı Inno Lipa HBV DRv2 kiti (Innogenetics, Belçika) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırıldı. Bu testte kısaca, HBV DNA izolasyonundan sonra Hot Start Taq DNA polimeraz kullanarak çoğaltma işlemi yapıldı, ardından çoğaltılan DNA ürünleri ters hibridizasyon yöntemi ile problar ile kaplanmış stripler üzerinde gösterildi.

Tanımlayıcı istatistik parametrelerinin (ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum) analizi için SPSS 18 (SPSS Inc, ABD) programı kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmada yer alan hastaların HBV DNA düzeyleri 1770 ile $22.1x10^7$ IU/ml arasında (ortalama: 4.5x107±73.56), ALT düzeyleri 12 ile 337 IU/ml (ortalama: 48.41±62.66) arasında değişmektedir. Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile mutasyon oranları Tablo 1'de sunulmuştur.

Çalışmamızda bir yıl lamivudin tedavisi kullanmış, kronik hepatitli 50 hastanın 12'sinde (%24) LAM direnci belirlenmiştir. On iki hastanın 6 (%50)'sında tek başına rtM204I (YIDD motifi)

Tablo 1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile mutasyon oranları.

Parametreler	
Yaş ortalaması (Yaş aralığı)	46.90±13.14 (21-77)
Cinsiyet, E/K, (n,%)	32/18 (64/36)
HBV DNA Ortalama (minimum-maksimum), (IU/ml)	$4.5x10^7$ ±73.56 (1770-$22.1x10^7$)
ALT, Ortalama (minimum-maksimum), (IU/ml)	48.41±62.66 (12-337)
Mutasyon saptanan (n,%)	12 (24)
Mutasyon saptanmayan (n,%)	38 (76)

E: Erkek; K: Kadın; ALT: alanin aminotransferaz.

Tablo 2. Lamivudin direnci belirlenen on iki hastadaki mutasyonların dağılımı.

Hasta	Cins/Yaş	HBV DNA Düzeyi IU/ml	Mutasyon	İlaç Direnci
1	E/63	221.000.000	rtL180M, rtA181T, rtM204I	LMV ve ADV
2	E/71	188.000.000	rtL180M, rtA181T	LMV ve ADV
3	K/39	48.100	rtL180M, rtA181T, rtM204I, rtV80I	LMV ve ADV + kompensatuvar
4	E/61	6.400	rtM204I	LMV
5	E/27	14.300	rtM204I	LMV
6	E/51	6.920	rtM204I	LMV
7	K/39	1.770	rtM204I	LMV
8	K/51	6.170	rtL180M, rtA181T, rtM204I, rtV80I	LMV ve ADV+ kompensatuvar
9	E/37	18.700	rtM 204I	LMV
10	E/49	2.990.000	rtM 204I	LMV
11	K/53	418.000	rtL180M, rtA181T	LMV ve ADV
12	K/24	81.486.830	rtL180M, rtA181T	LMV ve ADV

E:Erkek; K:Kadın; ALT: alanin aminotransferaz.

mutasyonu, dördünde (%33) LAM ve ADV direnci ile birlikte, iki hastada (%16.7) LAM/ADV+kompensatuvar mutasyon belirlenmiştir. Çalışmamızda saptanan antiviral direnç mutasyonları Tablo 2'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Kronik HBV enfeksiyon tedavisinde LAM en yaygın olarak kullanılan antiviraldir, ancak uzun süre tek başına kullanılması sonucunda direnç gelişir. Genotipik ilaç direncinin tespit edilmesi ile erken dönemde dirençli ilacın yerine, farklı bir ilaca geçerek tedaviyi değiştirmek ve başarı oranını arttırmak olası olabilmektedir. Lamivudin ile tedavide birinci yıldan sonra direnç gelişme oranları %20-25 arasında değişirken bu oran 5 yıl sonra %80 oranına ulaşır[15,16]. Bu çalışmada, bir yıl süre ile LAM kullanmış 50 hastanın 12'sinde (%24) LAM direncine neden olan mutasyonların varlığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, LAM dirençli suş oranları ve direnç tipleri farklılık göstermektedir[8-10,17-21].

Hepatit B virüsün polimeraz enzimini kodlayan P bölgesi 6 bölgeye ayrılır (A, B, C, D, E, F ve G). Nükleozid/nükleotid analogları ile ilişkili mutasyonlar en çok A, B, C ve D bölgelerinde gelişir. Bu mutasyonlar başlıca primer ilaç mutasyonları (rtI169T, rtA181T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtA194T, rtS202C/G/I, rtM204I/V/S, rtN236T, rtM250I/L/V) ve kompensatuvar mutasyonlar (rtL80I/V, rtV173L, rtL180M) olmak üzere iki grupta toplanırlar[22,23]. Lamivudin için 5 farklı direnç paterni; rtM204I, rtL180M + rtM204I, rtL180M + rtM204V, rtV173L + rtL180M + rtM204V, rtL80V/I + rtL180M + rtM204I mevcuttur[24].

Çalışmamızda en sık görülen LAM direnç mutasyonu %50 oranı ile rtM204I mutasyonu olmuştur. İkinci sıklıkta rt L180M, A181T mutasyonları tek başına ya da rtM204I ile birlikte gözlenmiştir. rtM204I ile birlikte diğer kompansatuvar mutasyonlardan rtV80I ise %16.7 oranında bulunmuştur. Kompansatuvar mutasyonlardan en yaygın görülen rtL180M (lösin-metionin değişikliği) mutasyonu olup, rtM204V/I mutasyonu içeren HBV polimerazın replikasyonuna yardımcı olur[25].

Cao ve ark.'nın[17] yaptığı çalışmada, LAM tedavisi sonrasında 53 hastanın 18'inde (%33.9) YMDD mutasyonu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, rtL180M/M204V, rtL180M/M204I, rtL180M ve rtM204I, olmak üzere 4 farklı mutasyon tipi belirlemişlerdir. Arslan ve ark.[18] çalışmaya alınan 20 olguya ait örneğin 12'sinde (%60) lamivudin direncine neden olan YMDD motif değişikliği belirlemişlerdir. Motif değişikliği olan 12 HBV-DNA örneğinin 11 (%91.6)'inde, YMDD değişikliği ve yaygın tip (wild type) kombinas-

yonu birlikte saptanmış, ayrıca izole YMDD değişikliği ve YVDD ya da YIDD kombinasyonları da gözlenmiştir. Akarsu ve ark.[9] inaktif hepatit B taşıyıcılarında Inno-Lipa testi ile yaptıkları çalışmada, 71 anti-HBe pozitif HBV taşıyıcısının 13'ünde (%18.3) YMDD motif değişikliği saptamışlardır. Çalışmadaki 13 YMDD motif değişikliğinin 8'ine L180M mutasyonunun eşlik ettiği ve L180M mutasyonu taşıyan olguların tümünde YVDD motif değişikliğinin bulunduğu bildirilmiştir. Kalaycıoğlu ve ark.'nın[19] çalışmalarında, LAM tedavisi almamış 25 kronik hepatit B'li hastanın 3 (%12)'ünde yalnızca LAM direnci saptanırken, hâlen LAM tedavisi almakta olan 19 hastanın 9'unda yalnızca LAM direnci, 2'sinde yalnızca ADV ve 1'inde LAM + ADV direnci olmak üzere toplam 12'sinde (%63.2) antiviral direnci saptanmıştır.

Aydoğan ve ark.'nın[20] KHB tanısı ile LAM tedavisi alan 71 hastaya ait serum örneğinde yaptıkları çalışmada, dizi analizi ile olguların %25.5'inde (13/51), LiPA testleri ile de %16'sında (9/56) dirençle ilişkili primer ve kompensatuvar mutasyonlar saptanmıştır. Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile LAM direnci ile ilişkili primer ve kompensatuvar çoklu mutasyonlar (bir örnekte L180M + M204I, iki örnekte L80I + L180M + M204I, bir örnekte L80I + M204I ve bir örnekte L80I/V + M204I), LAM direnci ile ilişkili primer tekli mutasyonlar (üç örnekte M204I ve bir örnekte M204V) belirlemişlerdir. Inno-Lipa HBV DRv3 testi ile ise LAM direnci ile ilişkili çoklu mutasyon olan iki örnekte ENT direnci ile ilişkili iki farklı mutasyon (G202 ve ILFM184) varlığı görülmüştür. Alagözlü ve ark.'nın[1] çalışmalarında kronik HBV enfeksiyonlu 41 hastaya ait serum örneklerinin 17'sinde (%41.5) Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile YMDD motif mutasyonları saptanmıştır.

İzole YIDD (rtM204I) mutasyonu rt L180M olmaksızın görülebilirken, YVDD (rtM204V) mutasyonuna hemen daima L180M mutasyonunun eşlik ettiği ve bu (rtM204V+rtL180M) mutasyonların izole rtM204I mutasyonuna göre çok daha düşük lamivudin direncine neden olduğu bildirilmektedir[21]. Bu çalışmada, mutasyon saptanan 12 hastadan 6'sında (%50) izole YIDD (rtM204I) tipi mutasyonu saptanmıştır. Aynı zamanda çalışmamızda, ADV tedavisi almadığı halde 4 hastada ADV direnç mutasyonu (rtA181T) belirlenmesi dikkat çekicidir. Bu nedenle tek başına LAM tedavisi alan hastalarda ADV direnci oluşturan mutasyonların olabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada, LAM kullanan kronik hepatit B hastalarında %24 oranında saptanan LAM direnci ülkemizin diğer bölgelerindekine benzer oranda bulunmuştur. İzole (tek başına) LAM direncinin yanı sıra LAM+ADV direnci ile kompensatuvar direnç tiplerinin de önemli oranda görülmüştür. Kronik HBV hastalarında gelişebilecek mutasyon profillerinin belirlenmesinin tedavinin başarısız olduğu durumda uygun antiviral tedavinin yeniden planlanmasında yararlı olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Alagözlü H, Özdemir Ö, Köksal B, Yılmaz A, Coşkun M.** Prevalence of common YMDD motif mutations in long term treated chronic HBV infections in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14:5489-94. https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.9.5489
2. **Komatsu H.** Hepatitis B virus: Where do we stand and what is the next step for eradication? *World J Gastroenterol* 2014; 20:8998-9016.
3. **Usluer G.** Kronik Hepatit B ve C'de tanı ve tedavi yaklaşımları. *ANKEM Derg* 2006; 20:37-43.
4. **Beşışık F.** Kronik B hepatiti tedavisinde nukleozid analogları. Tabak F, Balık D, Tekeli E (Ed). Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 3. Baskı. Istanbul, 2007:196-205.
5. **Leblebicioğlu H.** Hepatit B virüsde antiviral direnç sorunu. *ANKEM Derg* 2008; 22:48-52.
6. **Libbrecht E, Doutreloigne J, Van De Velde H, et al.** Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic Hepatitis B Virus-Infected patients during long-term lamivudine treatment, assessed by a Line Probe Assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3935-41. https://doi.org/10.1128/JCM.00020-07
7. **Çakaloğlu Y.** Hepatit B tedavisi: Kronik hepatit dışı

indikasyonlar, Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (Ed). Uluslararası Katılımlı I. Ulusal Viroloji Kongresi Konferanslar ve Bildiriler Kitabı. Öncü Basımevi, Ankara, 2003:187-9.

8. **Yuen MF, Kato T, Mizokami M, et al.** Clinical outcome and virologic profiles of severe hepatitis B exacerbation due to YMDD mutations. *J Hepatol* 2003; 39:850-5. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00388-X
9. **Akarsu M, Şengönül A, Tankurt E, et al.** YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:1783-8. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04567.x
10. **Tacke F, Kroy DC.** Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. *Ann Transl Med* 2016; 4:334. https://doi.org/10.21037/atm.2016.09.19
11. **Ghany MG, Doo EC.** Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology* 2009; 49(5 Suppl):S174-84. https://doi.org/10.1002/hep.22900
12. **Rodriguez-Frías F, Tabernero D, Quer J, et al.** Ultra-deep pyrosequencing detects conserved genomic sites and quantifies linkage of drug-resistant amino acid changes in the hepatitis B virus genome. *PLoS One* 2012; 7:e37874. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037874
13. **Degertekin B, Hussain M, Tan J, Oberhelman K, Lok AS.** Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *J Hepatol* 2009; 50:42-8. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.020
14. **Yang ZJ, Tu MZ, Liu J, Wang XL, Jin HZ.** Comparison of amplicon-sequencing, pyrosequencing and real-time PCR for detection of YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006; 12:7192-6. https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i44.7192
15. **Zoulim F, Locarnini S.** Management of treatment failure in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2012; 56(Suppl 1):S112-22. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(12)60012-9
16. **Delaney WE4th.** Molecular virology of chronic hepatitis B and C: parallels, contrasts and impact on drug development and treatment outcome. *Antiviral Res* 2013;99:34-48. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.04.010
17. **Cao XX, Li J, Qiu LM, Luo YW, Chen YH, Ran Y.** Identification factors associated with YMDD mutation in patients with chronic hepatitis B receiving lamivudine treatment. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2009;17:641-4.
18. **Arslan U, Ural O, Findik D.** Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B olgularında Inno-Lipa HBV DR yöntemi ile saptanan YMDD motif değişiklikleri. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42:445-50.
19. **Kalaycı R, Altındiş M, Gülamber G, Demirtürk N, Akcan Y, Demirdal T.** Kronik hepatit B ve hepatit C'li hastalarda genotip dağılımı ve hepatit B olgularında direnç paterninin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:237-43.
20. **Aydoğan S, Ergünay K, Balaban Y, ve ark.** Bir yıldan uzun süreli antiviral ilaç kullanan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:472-81. https://doi.org/10.5578/mb.5625
21. **Lee AJ, Lee CH, Jeon CH.** Analysis of reverse transcriptase gene mutations in the hepatitis B virus at a university hospital in Korea. *Ann Lab Med* 2014;34:230-4. https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.3.230
22. **Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, et al.** Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79:25-30. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.005
23. **Liu BM, Li T, Xu J, et al.** Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese. *Antiviral Res* 2010; 85:512-9. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.006
24. **Köse Ş, Turken M, Gül S.** Evaluation of lamivudine resistance assay using a molecular method in patients with chronic hepatitis B. *Viral Hepat J* 2015; 21:17-19. https://doi.org/10.4274/vhd.42204
25. **Lok AS, Lai CL, Leung N, et al.** Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125:1714-22. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.033

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(3):141-145, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.141

Olgu Sunumu

Liberya Kökenli *Plasmodium falciparum*'un Etken Olduğu İmporte Bir Sıtma Olgusu

Yüksel AKKAYA*, Mustafa ŞENGÜL, Zeynep UZUN***, Zühre ALPUA****, Emin Oğuzhan OĞUZ*****, Seher TOPLUOĞLU******, Ebru AYDIN********

** Denizli Halk Sağlığı Laboratuvarı*

*** Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

**** Denizli Devlet Hastanesi*

**** Denizli Çardak Devlet Hastanesi*

***** Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı*

****** Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı*

ÖZET

Bu rapor, Liberya'ya yaptığı bir iş yolculuğu sonrasında üşüme, titreme ve yüksek ateş bulguları ile hastaneye başvuran ve sıtma tanısı alan hastaya ait bir olgudur. Otuz dört yaşında erkek hasta, periferik kandan hazırlanan ince yayma ve kalın damla preparatlarının mikroskopisi sonucunda Plasmodium falciparum olarak değerlendirildi. Hastanın daha önce aldığı sıtma tedavisinde doksisiklinin yetersiz olması üzerine, yeni bir tedavi protokolü düzenlendi. Tedavi sonrası klinik iyileşme gözlenen hastada, yapılan kontrol amaçlı kan yaymasında sıtma parazitine rastlanmadı. Bu olgu sunumu ile son yıllarda sıtmanın endemik olduğu bölgelere yapılan yolculuk sonrası gelişebilecek sıtma hastalığına dikkat çekmekti.

Anahtar kelimeler: *Plasmodium falciparum, Liberya, yolculuk, importe sıtma*

SUMMARY

Plasmodium falciparum Malaria Imported from Liberia

This report presents a case of a patient who presented to the hospital with symptoms of chills, shivering and fever following his business trip to Liberia. The microscopic examination of the thick and thin films of peripheral blood smear revealed the existence of Plasmodium falciparum in the blood sample of the 34 year-old male patient. Doxycycline that the patient had been taking as a part of his ongoing malaria treatment was considered to be inadequate, so. A new treatment protocol was arranged. As a result of this new treatment protocol, the patient's condition improved clinically and no additional malaria parasite was found in the blood smears prepared at regular controls. The purpose of this case is to draw attention to the risk of getting infected with malaria after traveling to a region where the disease is endemic.

Key words: *Plasmodium falciparum, Liberia, travel, imported malaria*

GİRİŞ

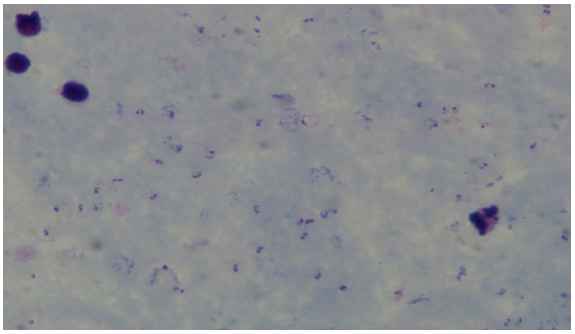
Sıtma dünyada ve ülkemizde hâlâ önemli bir sağlık sorunudur. Sıtma özellikle uluslararası yolculuk yapanlarda, turistik ya da mesleki amaçlı yolculuk edenlerde son dekatta belirgin sayıda artış göstermektedir. *Plasmodium* adı verilen, tek hücreli, hücre içi yerleşimli, bulaşıcı sıtma parazitinin insanda hastalık oluşturan, *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale* ve *Plasmodium knowlesi* olmak üzere beş ayrı türü bilinmektedir[1-3]. *P. vivax* dünyada geniş bir yayılım gösterirken, tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde sıtma enfeksiyonlarının %80'inden sorumludur. *P. falciparum* ise genel olarak tropikal bölgelerde görülmektedir. İkisi birlikte sıtma enfeksiyonlarının %95'ini oluşturmaktadır. *P. malariae*'nın dağılımı sporadik, *P. ovale* ise daha çok Batı Afrika ve bazı Güney

Alındığı tarih: 02.09.2016
Kabul tarihi: 14.11.2016
Yazışma adresi: Yüksel Akkaya, Denizli Halk Sağlığı Laboratuvarı, Denizli
e-posta: yakkaya2063@gmail.com

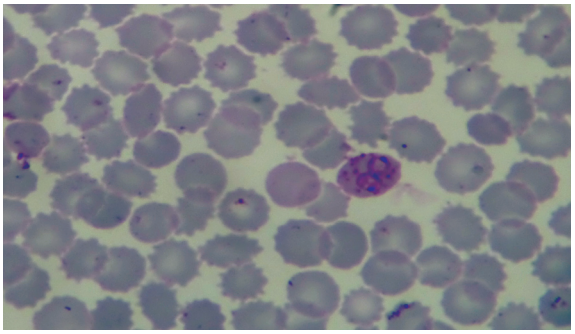
Pasifik Adaları'nda görülmektedir[4]. Ülkemizde geçmişte *P. vivax* olmakla beraber, yolculuk öyküsü bulunanlarda *P. falciparum, P. malariae* ve mikst olgular da saptanmaktadır[5-7]. DSÖ'nün 2014 raporuna göre 198 milyon klinik sıtma olgusu tespit edilmiş (%80'i Afrika kıtasında), bu olgulardan 584.000'i ölümle sonuçlanmıştır (<5 yaş altı çocuklar ve hamile anneler toplam ölüm olgularının %90'ı oluşturmaktadır)[4]. *Plasmodium* enfeksiyonlarının tanısı giemsa ile boyanmış kalın damla ve ince yayma preparatların mikroskobik incelenmesiyle konmaktadır[7,8]. Hastada aşırı normositik anemi, lökositoz, lökopeni, karaciğer enzimlerinde artış görülebilmektedir. *P. falciparum* sıtmasında ilk belirtiler hafif olabilmekle beraber, düşük parazitemi hızla akut sıtma atağına dönüşebilmektedir. Bu yüzden sıtmada hızlı tanı konulması son derece önemlidir.

OLGU

Denizli doğumlu 34 yaşında vinç operatörü olan erkek hasta, üç gündür devam eden üşüme titreme ve yüksek ateş yakınmasıyla Acıpayam Devlet Hastanesi'ne başvuran hastanın acil serviste ateşi düşürülerek eve gönderilmiştir. Yineleyen yüksek ateş nedeniyle yeniden Acil Servis'e getirilen hastadan alınan anamnezinde, hastanın 15 gün önce Batı Afrika kıyısında bulunan Liberya'dan geldiği saptanmıştır. Hastamızın geldiği yerde ebola virüs salgının bulunması, ebola salgınının ve *P. falciparum* sıtmasının klinik benzerliği nedeniyle öncelikle bu hastalığın ekarte edilmesini gerektirmiştir. Yapılan tetkiklerinde, beyaz küre sayısı 5200/μl, lökosit %75, lenfosit %13, hematokrit %36, hemoglobin 11.5 g/dl, ortalama eritrosit hacmi 62 fl, trombosit 123000 hücre/mm^3, C-reaktif protein (CRP) 2.7 mg/dl, sedimentasyon hızı 30 mm/saat, alanin aminotransferaz (ALT) 57 U/L, aspartat aminotransferaz (AST) 28 U/L ve laktik dehidrogenaz (LDH) 348 U/L olarak bulunmuştur. Bunun üzerine Denizli Devlet Hastanesi'ne ebola virüs enfeksiyonu öntanısı ile sevk edilmiş ve izole odaya yatırılmıştır. Denizli Devlet Hastanesi'ne getirildiğinde hastanın ateşi 36°C, kan basıncı 120/80 mmHg, nabız değeri 90/dakika ölçüldü. Hastanın bilinci açık, koopere, oryente idi ve ense sertliği yoktu, Traube alanı kapalı bulundu, diğer sistem muayeneleri normal olarak kaydedildi. Hastanın beyaz küre sayısı 3190-4470/mm^3, hemoglobin 10.1-11 g/dl, trombosit 110000-190000 hücre/mm^3, nötrofil %59.5-59.8, lökosit %15.6-27.7, total bilirubin 0.68 mg/dl, direkt bilirubin 0.29 mg/dl, total protein 7.6 g/dl ve albümin 3.6 g/dl olarak tespit edilmiştir. Anamnezinde 1 ay önce yapılan kart test ile sıtma tanısı aldığı ve doksisiklin ile tedavisine başlandığı belirlenmiştir. Ancak, klinik bulgularının devam etmesi nedeniyle sıtmanın tedavi edilmemiş olduğu şüphesiyle kalın damla ve ince yaymaları alınarak Denizli Halk Sağlığı Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda değerlendirilen kan yaymalarının sıtma ile uyumlu olması üzerine hasta izolasyondan çıkarılmıştır. Denizli Devlet Hastanesi'nde kandan yapılan tetkiklerinde, glukoz 230-188 mg/dl, üre 32-23 mg/dl, kreatin 0.84-0.70 mg/dl, AST 21 U/L, ALT 44 U/L, sodyum 133 mEq/L, potasyum 3.77 mEq/l, klor 104 mmol/L, CRP 5.21-0.79 mg/dl, eritrosit sedimentasyon hızı 55-30 mm/saat olarak saptandı. Hastanın idrar ve kan kültürlerinde üreme olmadı. Hastanın Denizli Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda hazırlanan kalın damla ve ince yayma kan preparatlarının May Grunwald ile tespiti ve Giemsa ile boyanması sonrasında yapılan mikroskobik incelemede eritrosit içerisinde parazitin yaygın ve farklı formları belirlenmiştir (Şekil 1, 2). Hastadan alınan yeni kan örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda ve Denizli Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda değerlendirildi. İnce yaymada rastlanan *Plasmodium* türleri, içinde birden fazla *Plasmodium* içeren eritrositlerin bulunması, enfekte eritrosit formlarının normal boyutlarda olması ve bazı eritrosit-



Şekil 1. Giemsa boyama ile kalın damla preparasyonda taşlı yüzük görüntüsü.



Şekil 2. Giemsa boyama ile ince yayma preprasyonda eritrosit içindeki ikili taşlı yüzük görüntüsü (1000X).

lerin içinde ikili ring formunun bulunması nedeniyle *Plasmodium falciparum* olarak değerlendirildi. Tanı Ankara'daki Ulusal Sıtma Referans Laboratuvarı'nda (Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Paraziter Hastalıklar Laboratuvarı) hastanın *P. falciparum* ile enfekte olduğu PCR ile gerçeklendi. Hastanın tedavisine artemether/lumefantrine tablet 2x4, 3 gün ve primakin 2x1, 14 gün süreyle antimalaryal ilaçlar ile başlanmış, hastaneye yatışının 2. gününde ateşi olmadığı tespit edilmiştir. Lökopenisi ve trombositopenisi düzelen hastaya tedavi süreciyle ilgili bilgi verilerek taburcu edilmiştir.

TARTIŞMA

Sıtma dünyada yaygın paraziter hastalıktır. Parazitik yaşayan *Plasmodium* ve vektörü anofel tarihi süreç boyunca insanlarla ortak coğrafik alanları paylaşmışlardır. Tarihsel süreç içinde gelişen insan toplulukları, parazitin yayılım sahası içinde bulunan Mezopotamya, Eti ve Grek gibi uygarlıklar, sıtma salgınlarından önemli ölçüde etkilenmiştir[5]. DSÖ'nün Avrupa bölgesinde sıtmanın eliminasyonuna yönelik çalışmaları devam etmektedir. DSÖ Avrupa'da 2013 yılında yalnızca 37 sıtma olgusu bildirmiştir (Yunanistan, Tacikistan ve Türkiye'de). Ülkemizde en sık klinik tabloya neden olan tür *P. vivax*'tır. Bu olgulara özellikle Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde daha sık rastlanmaktadır. Son yıllarda ülkemizde ilaçlama ve bataklıkların kurutulması gibi önleyici önlemlerle hastalığın prevelansında düşüşler gözlenmiştir. Son beş yıldır yeni olgu tespit edilmemiş yalnızca nüks ve emport kaynaklı olgular bildirilmiştir. Genellikle yolculuk ilişkili *P. falciparum*'a bağlı sıtma olgularına ya da *P. vivax*'ında olduğu miks olgulara daha fazla sayıda rastlanmaktadır. Saptanan bu olguların çoğu Ortadoğu, Afrika ve Uzakdoğu ülkelerindendir[4,8-16,18-20]. *P. falciparum* sıtması tropikal bölgelerde görülmektedir[5,8,17]. *P. falciparum* her yaştaki eritrositleri tutabilmekte ve bu nedenle çok yüksek değerlerde parazitemiye yol açabilmektedir. Nöbetler sırasında eritrositlerin parçalanmasıyla anemi, parçalanan eritrositlerden serbest kalan pigmentlerin kanda artmasıyla sarılık, bunların retiküloendotelial sistemde depolanmasıyla hepatosplenomegali gelişmektedir[10,12,14,21-23]. Sunulan olguda sistem muayeneleri normal olarak bulunmuştur. Hastada sıtma için klasik olan lökopeni, trombositopeni, karaciğer transaminazlarındaki yükselme görülmüş, verilen tedavi ile düzelmiştir.

Plasmodium falciparum enfeksiyonlarında en ciddi komplikasyon, mikrosirkülasyon bozulması sonucu ortaya çıkan serebral kan dolaşımı sorunlarıdır. Diğer önemli komplikasyonları arasında, karasu humması (zehirli sıtma), ağır anemi tablosu, akciğer ödemi ve damar içi pıhtı-

laşması bulunmaktadır[22].

Olgumuzda bu semptomlara rastlanmamıştır. *P. falciparum* eritrositin ancak 1/5'ini kapsamaktadır ve gametositleri karakteristik olarak muz şeklinde enfekte etmektedir. *P. vivax* sıtmasında da bazen 2 veya daha fazla parazitin eritrosit içinde görülebileceği bildirilmiştir[5,17,23]. Enfekte eritrositler, normalin 1.5-2 katı büyüklüğe ulaşmaktadır. Ancak *P. falciparum*'un etken olduğu sıtmada genellikle eritrosit boyutlarının normal olması, eritrosit içinde birden fazla halka formuna rastlanması, muz şekilli gametositlerin görülmesi karakteristiktir. *P. falciparum*'a ait olgumuzda kalın damla ve ince yayma preparat incelenmesi sonucunda muz şekkilli gametosit gözlenmemiş, eritrositler içinde tekli taşlı yüzük formu görülmesi ve birçok alanda eritrosit içinde 2'li taşlı yüzük şeklindeki trofozoitlerin görülmesiyle, beraberinde PCR ile yalnızca *P. falciparum* tespit edilmiştir[20,21,24].

Uluslararası dolaşımın serbest olması ve yolculukların artması nedeniyle sıtmanın endemik olduğu bölgelere yolculuk eden kişilerin sıtma enfeksiyon riski olduğundan kesinlikle kemoprofilaksi almaları ve kişisel korunma önlemlerinin vurgulanması gerekmektedir. Sıtmanın endemik olduğu ülkelere yolculuk öyküsü olan her hastanın kesinlikle sıtma yönünden değerlendirilmesi de gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **CDC.** Centers for Disease Control and Prevention About Malaria Biology Reports 2013.
2. **Garcia LS.** Malaria. *Clin Lab Med* 2010; 30:93-129. https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.001
3. **Özbilgin A, Topluoglu S, Es S, Islek E, Mollahaliloglu S, Erkoc Y.** Malaria in Turkey: successful control and strategies for achieving elimination. *Acta Trop* 2011; 120:15-23. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.06.011
4. **WHO.** World Malaria Report. World Health Organization, 2013.
5. http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/rapid_diagnostic_tests/en/ (Erişim Tarihi: Ekim 2016).
6. **Gökmen AA, Pektaş B, Öncel K, Özdemir OA, Çavuş İ, Özbilgin A.** Manisa ilinde 2008-2012 yılları arasında saptanan sıtma olgularının değerlendirilmesi. *Turkiye Parazitol Derg* 2014; 38:151-4.
7. **Karadağ A, Ünal N, Yanık K, Borucu R, Günaydın M, Hökelek M.** Endemik olmayan bir bölgede periferik kan incelenmesinde saptanan *Plasmodium* türlerinin değerlendirilmesi. *Turkiye Parazitol Derg* 2015; 39:5-8.
8. **Dündar İH, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editors.** Sıtma. İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:927- 47.
9. **Alver O, Yılmaz E, Akcağlar S, Töre O.** Bursa'da sıtma. *Turkiye Parazitol Derg* 2007; 31:249-55.
10. **Karaman U, Atambay M, Yaşar S, Çolak C, Miman O, Daldal N.** Malatya'da son yedi yıl içindeki sıtma olguları. *Turkiye Parazitol Derg* 2007; 31:245-8.
11. Yolculuk Sağlığı 2014. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Hudut ve Sahiller Sağlık Genel Müdürlüğü. http://www.yolculuksagligi.gov.tr (Erişim Tarihi: Eylül 2016).
12. **Ersan G, Ülker T, Akkoçlu G, Oğuz F, Köse Ş.** *Plasmodium falciparum*'un etken olduğu yurtdışı kaynaklı bir sıtma olgusu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18:239-40.
13. **Uludağ Altun H, Kurtoğlu Gul Y, Vudalı E, et al.** *Plasmodium falciparum* malaria case originating from Uganda. *Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37:229-32. https://doi.org/10.5152/tpd.2013.52
14. **Parlak E, Erturk A, Cayır Y, Parlak M.** Sporadik bir bölgede: Dört import sıtma olgusu. *Turkiye Parazitol Derg* 2013; 37:161-4. https://doi.org/10.5152/tpd.2013.36
15. **Önlen Y, Çulha G, Ocak S, Savaş L, Güllü M.** Yurtdışı kökenli *Plasmodium falciparum* sıtması: Dört olgu sunumu. *Turkiye Parazitol Derg* 2007; 31:256-9.
16. **Enginyurt O, Çetinkol Y, Özenç F.** Nijerya kökenli *Plasmodium falciparum* sıtması: Olgu sunumu *Gaziosmanpaşa Ünv Tıp Fak Derg* 2012; 4:51-4.
17. **Akdur R.** Sıtmanın epidemiyolojisi. Özcel MA, Editor. Sıtma. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:16, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1999; 119-22.
18. **Olut AI, Köse Ş, Özensoy Töz S, Karacan S, Dağcı H, Çevikel N.** Klorokine dirençli bir *Plasmodium falciparum* infeksiyonu: Olgu sunumu. *İnfeks Derg* 2005; 19:115-120.
19. Sıtma Savaş Daire Başkanlığı'nın Sıtma ile İlgili İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Sıtma Savaş Dairesi Başkanlığı. http://www.saglik.gov.tr/ (Erişim tarihi: Ekim 2016).
20. **Sönmez Tamer G, Dündar D, Yazıcıoğlu Y.** *Plasmodium falciparum* ve *Plasmodium vivax*'ın etken

olduğu importe sıtma olgusu. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2008; 65:135-8.

21. **Demiraslan H, Erdoğan E, Türe Z, Kuk S, Yazar S, Metan G.** Yurt dışı kaynaklı *Plasmodium falciparum* sıtmalı olguların değerlendirilmesi: Tanıda polimeraz zincir reaksiyonunun yeri. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:668-76. https://doi.org/10.5578/mb.6249
22. **Fairhust MR, Wellems ET.** *Plasmodium* species (Malaria). In: MandellGL, Bennett JE, Dolin R (editors). Principles and Practise of Infectious Diseases. 7th Ed, Philaldelphia: Churchill Livingstone, 2009: 3437-62.
23. **Özçelik S, Çeliksöz A.** *Plasmodium* türlerinde yapı ve yaşam döngüsü. Özcel MA, Editor. Sıtma. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:16, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1999; 13-35.
24. **Özbilgin A, Tamay AT.** Sıtma tanısında yenilikler. *ANKEM Derg* 2000;14:260-5.
25. **Ardıç N, Koru Ö.** Sıtmada hızlı tanı testleri. *Nobel Med* 2011; 8:10-15.

PCT Sonuçlarının Kalitesine Güveniyor musunuz?

Thermo SCIENTIFIC
A Thermo Fisher Scientific Brand

Kanıtlanmış klinik cut-off'lar ve algoritmalar, orijinal yüksek duyarlılıklı B·R·A·H·M·S PCT™ metodu için geçerlidir. Orijinal Prokalsitonin metodu olan B·R·A·H·M·S PCT™; bakteriyel enfeksiyon ve sepsisin[1] tanı ve risk değerlendirmesindeki doğruluğu iyileştirir ve antibiyotik tedavi kararına yön verecek hassasiyeti sağlar.[2] Hayat kurtarmak söz konusu olduğunda, kalite bir tercih değil gerekliliktir. **Güvenilir bir klinik karar için**, sadece kaliteli Prokalsitonin testlerine güvenin. **Emin olun, güvende olun.**

B·R·A·H·M·S PCT testleri

• Daha fazla bilgi için bizi ziyaret edin thermoscientific.com/procalcitonin

Otomatik hassas testler
B·R·A·H·M·S PCT™ sensitive KRYPTOR™
ADVIA Centaur® B·R·A·H·M·S PCT™
ELECSYS® B·R·A·H·M·S PCT™
LIAISON® B·R·A·H·M·S PCT™ II GEN
Lumipulse® G B·R·A·H·M·S PCT™
VIDAS® B·R·A·H·M·S PCT™

Manuel testler
B·R·A·H·M·S PCT™ LIA

POC testleri
B·R·A·H·M·S PCT-Q™
Samsung IB B·R·A·H·M·S PCT™

Daha fazla bilgi için:
info.pct@thermofisher.com

1. Soni N.J. et al., J Hosp Med 2013;8 (9): 530-40. 2. Meisner, M., Procalcitonin – Biochemistry and Clinical Diagnosis, UNI-MED (Bremen) 2010; ISBN 978-3-8374-1241-3.
© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Tüm hakları saklıdır. Copyrights in and to the image "Doctor at the ER attending an emergency" are owned by a third party and licensed for limited use only to Thermo Fisher Scientific by iStockphoto LP. All rights reserved. B·R·A·H·M·S PCT™ and all other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. ADVIA Centaur® is a registered and protected trademark belonging to Siemens Healthcare Diagnostics. ADVIA Centaur® B·R·A·H·M·S PCT™ is a product of Siemens Healthcare Diagnostics licensed from Thermo Fisher Scientific. Elecsys® is a registered and protected trademark belonging to Roche or one of its subsidiaries. Elecsys® B·R·A·H·M·S PCT™ is a product of Roche licensed from Thermo Fisher Scientific. LIAISON® is a registered and protected trademark belonging to DiaSorin S.p.A. LIAISON® B·R·A·H·M·S PCT™ II GEN is a product of DiaSorin S.p.A licensed from Thermo Fisher Scientific. Lumipulse® is a registered trademark of Fujirebio Inc. in Japan and in other countries. Lumipulse® G B·R·A·H·M·S PCT™ is a product of Fujirebio Inc. licensed from Thermo Fisher Scientific. Samsung IB B·R·A·H·M·S PCT™ is a product of Samsung C&T Corporation licensed from Thermo Fisher Scientific. VIDAS® is a registered trademark of bioMérieux S.A. or one of its subsidiaries. VIDAS® B·R·A·H·M·S PCT™ is a product of bioMérieux licensed from Thermo Fisher Scientific. KRYPTOR is a registered trademark of CIS bio international, licensed for use by B·R·A·H·M·S, a part of Thermo Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific ürünlerinin dağıtımı dünya genelinde yapılmaktadır; bu baskıda bahsi geçen hedeflenen kullanımların ve uygulamaların tamamı her ülkede müsecce değildir.

thermoscientific.com/procalcitonin

YAZARLARA BİLGİ

- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin yayın organı olup ilgili alanlardaki özgün araştırma, derleme, olgu sunumu, bilimsel haberler, bilimsel kitap ve dergi tanıtım yazıları ile okuyucu mektuplarını yayımlayan hakemli bir dergidir.
- Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık olmak üzere üç ayda bir çıkar ve dört sayıda bir cilt tamamlanır.
- Yazılar Türkçe olarak yollanmalıdır.
- Yazıların sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yayımlanması istenen metnin dayandığı çalışma, daha önce bir yerde yayımlanmamış ya da yayımlamak üzere teslim edilmiş veya kabul edilmiş olmamalıdır. Özet biçiminde yayımlanmış bir ön bildirinin bitmiş biçimine yer verilebilir.
- Dergiye gönderilen yazılar, ilk olarak dergi standartları açısından incelenir. Derginin istediği forma uymayan yazılar, daha ileri bir incelemeye gerek görülmeksizin yazarlarına iade edilir. Bu nedenle gereksiz yere zaman ve emek kaybına yol açılmaması için, yazı sahipleri dergi kurallarını dikkatli incelemek zorundadır.
- Dergi kurallarına uygunluğuna karar verilen yazılar konu ile ilgili kişilerden en az iki hakeme gönderilir ve hakemlerden yayına uygun olup olmadığı konusunda görüşleri alınır. Düzeltme isteniyorsa tekrar yazara gönderilir ve düzeltmelerin bir ay içinde yapılması gerekir. Bu incelemeden geçen yazılar, Yayın Kurulu tarafından tekrar değerlendirilir ve basılacağı yer ve sayı kararlaştırılır.
- Danışma ve Yayın Kurulları; düzeltme, kontrol ve dizgi aşamasında yayıncı, yazılarda düzeltme yapmak, biçiminde değişiklikler istemek ve yazarları bilgilendirerek kısaltma yapmak yetkisine sahiptir. Yazarlardan istenen değişiklik ve düzeltmeler yapılana kadar, söz konusu yazılar yayın programına alınmayacaktır.
- Teslim edilmiş bir metnin tümünün veya bir bölümünün bir başka yerde yayımlanması söz konusu olursa editörlere bilgi verilmesi zorunludur.
- Yayımlanması kabul edilmeyen metinler geri verilmez.

Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Tüm yazılar .doc formatında word dosyası şeklinde **tmcdeditor@gmail.com** adresine yollanmalıdır.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve telif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.
- İnsanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalarla ilgili olarak etik kurulların onaylarının ve gönüllülerden alınmış yazılı onam formlarının da on-line olarak ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.

Prof. Dr. Çağrı Ergin

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası
Kınıklı / Denizli
Tel: 0 (258) 296 24 91
E-posta: tmcdeditor@gmail.com

Metin Çeşitleri

- Özgün Araştırma: En çok 15 sayfa; gerekli ve uygun sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 250 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; Türkçe ve İngilizce en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Derleme: En çok 20 sayfa; 1-4 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 200 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Mini Derleme: En çok 10 sayfa; 1-4 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 50 kaynak; 200 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Olgu Sunum: En çok 5 sayfa; yeterli sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 50 kaynak; 200 sözcüğü geçmeyen İngilizce-Türkçe özet; en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Editöre Mektup: Daha önce yayımlanmış olan bir yazı hakkında olabilir. Yeni bir araştırmaya ait bulguların bildirilmesi durumunda ise en çok 2 sayfa, çok gerekli durumlarda 1 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik ve en çok 5 kaynak içerebilir.

Metin Bölümleri

1. Başlık Sayfası

- Yazının kısa, açık ve içeriği tam yansıtır Türkçe başlığı
- Türkçe başlık ile birebir uyuşan İngilizce başlık
- Yazarların adları
- Yazarların çalıştığı merkezler
- İletişimden sorumlu yazarın; adı, adresi, telefon-faks numarası ve e-posta adresi
- Araştırma daha önce bir bilimsel toplantıda bildiri (sözlü veya poster) olarak sunulmuş ise, bu bilgi toplantının adı ve tarihiyle birlikte belirtilmelidir.

2. Özet Sayfası

- Türkçe ve İngilizce özetler başlık sayfasından sonraki sayfada yer almalıdır ve bire bir uyumlu olmalıdır.
- Özetler yazının türüne uygun sayıda sözcük içermelidir.
- Türkçe özetin arkasından Türkçe anahtar sözcükler (en az 3 sözcük), İngilizce özetin ardından İngilizce anahtar sözcükler (en az 3 sözcük) gelmelidir.
- Özgün araştırma metinlerinde hem Türkçe hem de İngilizce özetler bölünmüş olmalıdır. Amaç, gereç ve yöntem, bulgular ve sonuç bölümlerine ayrılmalıdır.
- Olgu sunumu, derleme, editöre mektup gibi diğer metin çeşitlerinde bölümlü özet hazırlamaya gerek yoktur.
- Özet bölümünde kısaltmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalı ve kaynak, şekil, tablo ve atıf yer almamalıdır.

3. Ana Metin Sayfaları

- Ana metin sayfaları, metin çeşidine göre bölümlendirilmelidir. Özgün araştırmalar amacın belirtildiği giriş, gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma kısımlarından oluşmalıdır. Bulgu ve tartışmanın kısa olduğu metinlerde iki başlık birleştirilerek de aktarılabilir. Olgu sunumu amacın belirtildiği kısa bir girişten sonra detaylı olgu ve tartışmadan oluşmalıdır. Derlemelerde önce kısa bir giriş yapılmalıdır ve ardından derlemenin konusuna uygun oluşturulmuş bölümleri kapsamalıdır.

- Mikroorganizma adlan ve MİK veya PFGE gibi kısaltmalar ilk kullanıldıklarında tam olarak, açık şekilleriyle yazılmalı mikroorganizma adı daha sonraki kullanımlarda cins adının ilk harfi kullanılarak kısaltılmalıdır. *Staphylococcus aureus S. aureus* gibi.
- *Escherichia coli* ve *Entamoeba coli* gibi, kısaltmaları aynı olacak adlar aynı yazıda geçtiğinde yazı boyunca kısaltılmadan kullanılmalıdır. Stafilokok, streptokok gibi sadece cins adı geçen cümlelerde dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir.
- Yanında birim gösterilmeyen ondan küçük sayılar yazı ile yazılmalı, rakam ile yazılan sayılara takılar kesme işareti ile eklenmelidir. Üç hasta, suşların 28'i gibi. Mümkün olduğunca cümlelere sayılarla başlanmamalıdır.
- Boyama yöntemi olan Gram büyük harfle yazılmalıdır. Bakteri tanımlamasında ise küçük harf kullanılmalıdır. Örneğin gram negatif kok yazılmalıdır. Negatif / pozitif kelimeleri açık olarak yazılmalı; (-) veya (+) kısaltmaları kullanılmamalıdır.

4. Teşekkür ve Diğer Vurgular

- Bir teşekkür yazısı varsa Kaynaklar'dan önce olmalıdır.
- Çalışma kazanılmış bir burs veya proje ile tamamlanmışsa belirtilmelidir.

5. Kaynaklar

- Kaynaklar listesinde yer alan kaynakların tamamının metin içinde kullanılmış olması gereklidir.
- Kaynaklar metin içinde geçiş sırasına göre sıralanmalı ve metin içinde cümle sonuna konacak parantez içine Arap rakamları ile yazılmalıdır. Örneğin; ..... gösterilmiştir (1,5,6).
- Metinde kaynak verilirken yazar adı kullanılıyorsa kaynak numarası yazar adının yanına yazılmalıdır. Örneğin; Smith ve Gordon'a (4) göre .....
- Henüz yayınlanmamış veriler ve çalışmalar kaynaklar bölümünde yer almamalıdır.
- Dergimiz, başka çalışmalarda bildirilen kaynakların aktarma şeklinde kullanılmasını kabul etmemektedir. Bir kaynağın aslından yararlanılmamış olduğu düşünüldüğünde, yazarından söz konusu kaynak ya da kaynakların ilk sayfalarının fotokopilerini göndermesi istenir. Yazarlar tarafından doğrulanmayan kaynaklar dizgi aşamasında yazıdan ayıklanacaktır.
- Kaynaklarda, yazar sayısının altı veya daha az olması durumunda tüm yazarların isimleri yazılmalıdır. Yazar sayısının altıdan fazla olması durumunda ise ilk üç yazarın ismi yazılmalı, sonrasında Türkçe makalelerde "ve ark.", İngilizce makalelerde ise "et al." ilave edilmelidir.
- Dergi isimlerinin kısaltılması Index Medicus'taki stile uygun olarak yapılmalıdır (www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html). Index Medicus'ta bulunmayan dergi adları kısaltılmadan yazılmalıdır.
- Dergide kaynaklar yazılırken aşağıdaki örnekler esas alınmalı; noktalamalar, kelime ve harf aralıkları, büyük harfler, dergi ve cilt numarası buna göre düzenlenmelidir.

Örnekler

A. Makaleler

- Standart Dergi Makalesi: Davies J, Courvalin P. Mechanisms of resistance. *Amer J Med* 1977; 62:868-72.
- Dergi Ekinde (Supplement) yer alan makale: Frumin AM, Jennings H. Functional asplenia. *J Infec Dis* 1992; 165 (Suppl 1):S156-8.
- Yazarı verilmemiş makale: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J* 1981; 283:628.
- Elektronik formatta makale: Mansur T, Artunkal S. *Fusarium oxysporum* infection of stasis ulser: eradication with measures aimed to improve stasis. *Mycosis* 2009 (DOI: 10.1111/j.1439 0507.2009.01800.x)

B. Kitaplar

- Kitap: Pelczar MJ, Chan ACS, Krieg S. Microbiology. 5th ed. New York: McGrew Hill Co, 2003. Bir kuruluş tarafından yayımlanmış olan kitaplarda basımevinin değil, yayımlanan kuruluşun adı ve varsa yayın numarası kullanılmalıdır. Örneğin "İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi Yayın No 20, 1956." gibi.
- Kitap Bölüm: Cade AR. Gump WS. The bisphenols. In: Reddish GF, Davies J, eds. Antiseptics, Disinfectants and Fungicides. 2nd ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1957: 1657-9.
- Kongre Konuşma, Bildiri Özeti: Seyer A, Yaman M. Çeşitli besiyerlerinde *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. XI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, 21-25 Ekim 2008, Antalya: Türkiye. Sayfa 509.
- Tez: Küçüker M. Mikoplazmalar [doktora]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 1986.

C. Sanal Ortam

- Web sitesi: World Health Organization. Global strategy. Geneva: World Health Organization. 2001 [http://www.who.intemational].

6. Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler ana metin içine yerleştirilmiş halde gönderilmemelidir. Tablolar, kaynaklardan sonra her sayfada bir tablo olacak şekilde yazının gönderildiği dosya içinde olmalıdır. Diğer dökümanlar ise ayrı dosyalar halinde gönderilmelidir.
- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler Arap rakamları ile numaralandırılmalı ve yazı içinde geçtiği yerler belirtilmelidir.
- Tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne, sol kenardan başlanarak yazılmalı ve tablo sıra numarasından sonra nokta kullanılmalıdır. Örneğin; **Tablo 1.** E.coli izolatlarının MİK dağılımları, gibi.
- Tablolarda kullanılan kısaltmalar alt kısımda mutlaka açıklanmalıdır.
- Tablolarda metnin tekrarı olmamalıdır.
- Şekil, fotoğraf, resim ve grafiklere ait açıklamalar ana metinle beraber en sona eklenerek yollanmalıdır.
- Şekillerde ölçü önemli ise üzerine cm veya mm'yi gösteren bir ölçek çizgisi konmalıdır.
- Fotoğraflar tanınmayı engelleyecek şekilde olmalı ve hastalardan yazılı onam alınmalıdır.
- İsim, baş harfler, hastane kayıt numarası gibi kimlik bilgileri yazılmamalıdır.
- Renkli resim için yazarlardan ayrıca ücret talep edilir.
- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler gibi dökümanlar başka bir yayından alıntı ise yazılı baskı izni mutlaka gönderilmelidir.