

Cilt / Volume 46

Sayı / Number 4

Aralık / December 2016

ISSN 0258-2171

e-ISSN 2458-7516



# Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

*Journal of Turkish Society of Microbiology*

- ✓ Bir "Süper Organizma" Olarak İnsan; Mikrobiyomun Genetik Kontrolü
- ✓ Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinden Saptanan Viral Etkenler
- ✓ Viral Solunum Yolu Enfeksiyonlarının Tanısında Bir Multipleks PCR Yönteminin Performansının Değerlendirilmesi
- ✓ Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması

ISSN 0258-2171  
e-ISSN 2458-7516

---

# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

*JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY*

---



**Cilt / Volume 46**

**Sayı / Number 4**

**Aralık / December 2016**



# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

## JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 46 Sayı / Number 4 Aralık / December 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-AI;** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

### Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

*A. Esin Aktaş (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi)*

*Nural Cevahir (Pamukkale Üniversitesi)*

*Nuri Özkütük (Celal Bayar Üniversitesi)*

*Gönül Aslan (Mersin Üniversitesi)*

*Selma Gökahmetoğlu (Erciyes Üniversitesi)*

*Ahmet Pınar (Hacettepe Üniversitesi)*

*Neriman Aydın (Adnan Menderes Üniversitesi)*

*İlknur Kaleli (Pamukkale Üniversitesi)*

*Ş. Rüçhan Sertöz (Ege Üniversitesi)*

*Selim Badur (İstanbul Üniversitesi)*

*Dilek Yeşim Metin (Ege Üniversitesi)*

*Tercan Us (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi)*

*Asuman Birinci (Ondokuzmayıs Üniversitesi)*

*Alpay Özbek (Dokuz Eylül Üniversitesi)*

*Meltem Yalınay (Gazi Üniversitesi)*

*Vildan Caner (Pamukkale Üniversitesi)*

*Yakut Akyön Yılmaz (Hacettepe Üniversitesi)*

*Yayımlanan sayıya ait değerlendirme sürecini kapsamaktadır.*

“TÜBİTAK ULAKBİM Tıp Veri Tabanı” ve “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:** tmcdditor@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*



## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### **DERLEME / REVIEW**

- **Bir “Süper Organizma” Olarak İnsan; Mikrobiyomun Genetik Kontrolü**  
*Human Being as a “Superorganism”; Genetic Control of Microbiome*  
Aycan GÜNDOĞDU ..... **147-151**

### **ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS**

- **Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinden Saptanan Viral Etkenler**  
*Viral Agents Identified in Cerebrospinal Fluid Samples*  
Rabia CAN SARINOĞLU, İmran SAĞLIK, Derya MUTLU, Betil ÖZHAK BAYSAN,  
Dilara ÖĞÜNÇ, Dilek ÇOLAK ..... **152-158**
- **Viral Solunum Yolu Enfeksiyonlarının Tanısında Bir Multipleks PCR Yönteminin Performansının Değerlendirilmesi**  
*Evaluation of the Performance of a Multiplex PCR Method for the Diagnosis of Viral Respiratory Tract Infections*  
Ayşe ARSLAN, Candan ÇİÇEK, Eylem Ulaş SAZ, Figen GÜLEN,  
Haydar SOYDANER KARAKUŞ ..... **159-164**
- **Konya İlinde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Suşlarının Birinci Seçenek Anti-tüberküloz İlaçlara Direnç Oranları**  
*Resistance Rates of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains to the Primary Anti-tuberculosis Drugs in Konya Province, Turkey*  
Fatma ESENKAYA TAŞBENT, Metin DOĞAN ..... **165-171**

• **İnfluenza Referans Laboratuvarı 2015-2016 Grip Sürveyans Verileri**

*Influenza Surveillance Data of Influenza Reference Laboratory for 2015-2016 Flu Season*

Sevim MEŞE, Aysun UYANIK, Serkan ASAR, Ali AĞAÇFİDAN, Osman Şadi YENEN ..... **172-180**

• **Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması**

*Investigation of the Presence of Class D Beta-lactamases in Clinical Isolates of*

*Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii*

Demet GÜR VURAL, Belma DURUPINAR ..... **181-187**

**OLGU SUNUMU / CASE REPORT**

• **Bir Üniversite Hastanesinde Kriptokokkoz Olguları**

*Cryptococcosis Cases in a University Hospital*

Asuman BİRİNCİ, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, Gumral ALAKBAROVA ..... **189-191**

DİZİN ..... **V-X**

YAZARLARA BİLGİ ..... **XI-XII**

# Bir “Süper Organizma” Olarak İnsan; Mikrobiyomun Genetik Kontrolü

Aycan GÜNDOĞDU\*,\*\*

\*Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

\*\*Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Kayseri

## ÖZ

Genom biliminin son yıllarda göstermiş olduğu gelişmeler, kültürleme ve izolasyon olmaksızın mikroorganizmalar ile çalışılabilmesine olanak sağlayan metagenom yaklaşımlarını ortaya çıkarmıştır. Bu teknik ilerlemenin ışığında insan ile ortak bir yaşam sürdüren ve dolayısıyla insanın bir süperorganizma olarak tanımlanmasına neden olan mikrobiyomun hastalık ve sağlık durumundaki rolü tanımlanmıştır. Buna göre hastalık durumunda mikrobiyom önemli değişikliklere (disbiyoz) uğramaktadır. Öte yandan, kısa bir süre önce insan genomundaki genetik varyasyonların insan mikrobiyomundaki taksonomik ünitelerin varlığı/yokluğu veya bağıl bollukları ile ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgular bir araya getirildiğinde görülmektedir ki belli hastalıklarla (Örn. diyabet, artrit gibi kompleks hastalıklar) ilişkilendirilen genetik varyasyonların önemli bir bölümü aynı zamanda bu hastalıklarla ilişkilendirilmiş mikrobiyom değişimleriyle örtüşmektedir. Söz konusu yeni bulgulara göre hastalık ve genetik faktörler denklemine ayrıca konak genetiğiyle ilişkili olacak şekilde mikrobiyom içeriğinin de önümüzdeki süreçte girmesi beklenmektedir. Dolayısıyla, insan genomu ve insan mikrobiyomunu kapsayacak toplu metagenomik ve diğer omik yaklaşımların hastalık kapsamında incelendiği yeni deney tasarımlarına önümüzdeki süreçte gereksinim duyulacaktır. İnsan genomu-insan mikrobiyomu ilişkisinin hem epistatik hem de pleiotropik olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmaların genetik varyasyonlar ve mikrobiyom analizi çoklu gen etkisini göz önünde bulunduracak bir metagenom boyu ilişkilendirme çalışması (MGWAS) biyoinformatiği üzerinde şekillenmesi kaçınılmaz görülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** İnsan mikrobiyomu, genomik, kompleks hastalıklar

## ABSTRACT

### **Human Being as a “Superorganism”; Genetic Control of Microbiome**

With the latest advancements in genomic science, the approach of metagenomics that enables to study microorganisms without any need of culturing and isolation has evolved. In the light of these technical achievements the role of the human microbiome in health and disease states has started to be revealed, redefining human being as a ‘superorganism’. Accordingly, human microbiome is subject to significant changes in disease state called dysbiosis. On the other hand, it was reported a short while ago that some genetic variations in human genome are associated with the microbial components of human microbiome and the presence/absence or relative abundance of taxonomic units in it. When all of these findings are gathered, it can be observed that an important portion of the genetic variations associated with diseases (e.g. diabetes, arthritis) are also overlapped with related microbiomic variations. A novel factor, microbiome, is expected to weigh in the relationship of the disease and the host genetics in the near future. Therefore novel experimental designs encompassing metagenomic, and other omic analyses of human genome-human microbiome, as well as other omics, in the context of disease will be needed. Human genome-human microbiome relationship is presumably both epistatic and pleiotropic. For that reason, it is inevitable that the future genomic projections should employ Metagenome-Wide Association Studies (MGWAS) bioinformatics considering the multi-genic effects of genetic variations and the microbiome analysis.

**Keywords:** Human microbiome, genomics, complex diseases

## GİRİŞ

Geçtiğimiz 20 yılda, sağlık bilimlerinin bakış açısını değiştiren iki önemli projeye tanıklık edilmiştir: İnsan Genom Projesi (İGP, Human Genome Project-1990-2003)<sup>(1)</sup> ve İnsan

Mikrobiyom Projesi (İMP, Human Microbiome Project-2008-2012)<sup>(2)</sup>. İnsana ait tüm genetik bilginin ortaya çıkarılmasının amaçlandığı İGP’nin ilk yıllarında, referans genom dizilerinin elde edilmesiyle hastalıklara ait genetik bilgilerin kolaylıkla elde edilebileceği görüşü

**Alındığı tarih:** 05.09.2016

**Kabul tarihi:** 20.12.2016

**Yazma adresi:** Aycan Gündoğdu, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 38039 Kayseri

**e-posta:** agundogdu@erciyes.edu.tr

yaygındı. Fakat, geniş çaplı hastalık-kontrol kohortlarının genetik farklılıklarının incelendiği -geçtiğimiz 10 yıla damgasını vuran-Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları (Genome-wide association studies-GWAS) ile birlikte bu görüş terk edilmeye başlanmıştır<sup>(3)</sup>. Kabul gören yeni görüşe göre etki büyüklüğü (İng. effect size) çok yüksek olan Mendeliyen hastalıklar hariç bilinen birçok hastalık, içerisinde çok sayıda genin yanında genetik ve epigenetik dışı çevresel faktörlerin rol oynadığı kompleks ve sistem seviyesinde bozukluklar ile ilişkilidir<sup>(4)</sup>.

### İnsan Mikrobiyomu

Vücudumuzun flora elamanları (bakteri, arkea, virus, mantar ve diğer tek hücreli ökaryotlar), bunların genomları ve çevreleyen ortamın bütünü olarak tanımlanan mikrobiyom, insan ile simbiyotik bir “süperorganizma” oluşturmaktadır. Vücudumuzdaki mikrobiyal hücrelerin sayısı toplam insan hücreleri sayısından 10 kat fazla olduğu gibi, milyonlarca farklı gene sahip mikrobiyom elemanları yaklaşık 20000 gene sahip insan genomundan çok daha büyük bir proteom kodlama ve metabolom üretme potansiyeline sahiptir<sup>(5)</sup>. Bu komünitenin büyük bir kısmını oluşturan bağırsak mikrobiyomu, insan ve çevresel faktörler (Örn. besin, patojenik organizmalar, toksinler vb.) arasında bir ara yüz oluşturarak çok sayıda metabolik faaliyette (besin sindirimi<sup>(6)</sup>, vitamin biyosentezi<sup>(7)</sup>, davranış yanıtı<sup>(8)</sup> gibi) insana ortaklık etmektedir. Doğum şekli ve doğumla aktarılan maternal mikrobiyom<sup>(9)</sup>, bebeklik dönemindeki beslenme<sup>(10)</sup>, beslenme düzeni<sup>(11)</sup>, yaşam alanı<sup>(12)</sup>, sosyal etkileşim<sup>(13)</sup> zenobiyotiklere maruz kalma<sup>(14)</sup>, patojen ve parazit organizmalar<sup>(15,16)</sup> mikrobiyom içeriğinin oluşumunu etkileyen çevresel etkenler olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, mikrobiyomun konakla olan etkileşimi bu oluşumu doğrudan etkileyen bir diğer faktördür.

### Mikrobiyom çalışmaları

Hastalık/sağlık durumunda insan mikrobiyomunun durumunu inceleyen çalışmalar oldukça yeni olmakla beraber, bu çalışmalarda mikrobiyomun yalnızca hastalık fenotipiyle (insan metabolizması ya da genomuna bakılmaksızın hastalık disbiyozuyla) olan ilişkisine yoğunlaşılmaktadır. Örneğin, obezite, tip I ve tip II diyabet, Crohn hastalığı, sedef hastalığı, inflamuar bağırsak hastalığı ve kolon kanserinde bağırsak mikrobiyomunun disbiyozu uğradığı ve farklı bir metabolik karaktere büründüğü ortaya konulmuştur<sup>(17)</sup>. Bunlara ek olarak, merkezi sinir sistemi ve gastrointestinal sistem eksenindeki etkileşimde bağırsak florasının otonomik nöral, enterik nöral, nöroendokrin ve immün kanallar üzerinden karmaşık bir iletişim etkisi olduğu ortaya atılmıştır<sup>(18)</sup>. Söz konusu çalışmaların çoğunluğunda mikroorganizma DNA’sının bütünü değil, yalnızca taksonomik profilleri ortaya çıkarabilecek olan 16S rRNA dizilenmesi yaklaşımıyla yürütülmüştür. Pekin Genom Enstitüsü (Beijing Genomics Institute-BGI) tarafından yapılan bir dizi metagenom projesinde ise shotgun dizileme üzerinden tip-2 diyabet disbiyozuna ait biyobelirteçler<sup>(19)</sup> ve romatoid artrit mikrobiyom değişimi ortaya çıkarılmıştır<sup>(20)</sup>.

### İnsan Genomu ve Mikrobiyom

İnsan mikrobiyomunun konak genetiği ile ilişkili olduğu görüşü ilk olarak 2010 yılında Benson ve ark.<sup>(21)</sup> tarafından ortaya atılmıştır. Altı yüz kırk beş fare üzerinden yürütülen söz konusu deneysel çalışmada, bağırsak mikrobiyomuyla ilişkili 18 kantitatif özellik lokusu (Quantitative Trait Loci-QTL) tanımlanmıştır<sup>(21)</sup>. Sonraki yıllarda daha fazla ilişkili genom bölgesinin ortaya konulduğu hayvan deneylerini içeren araştırmalar yayımlanmıştır<sup>(22,23)</sup>. Bu çalışmaların tümü incelendiğinde, mikrobiyom çeşitliliği ile ilgili tespit edilen QTL bölgelerinin *Irak3*, *Lyz1*, *Lyz2*, *Ifng* ve *Il22* gibi bağışıklık regülasyonunda rol

alan genler içeriyor olması oldukça dikkat çekicidir.

İnsan genomu-insan mikrobiyomu ilişkisini ortaya koyan insan temelli ilk çalışmalar; (i) yakın akrabaların mikrobiyal çeşitliliğinin benzer olduğu gözlemi<sup>(24)</sup> ve (ii) tek yumurta ikizlerindeki mikrobiyom taksonomik ünite benzerliğinin çift yumurta ikizlerine oranla istatistiki biçimde anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğunu gösteren araştırmalardır<sup>(25,26)</sup>. Bu çalışmalar kalıtsallık hakkında ipuçları sunmuş olsalar da herhangi bir insan genomu verisi içermediği için söz konusu ilişkinin ne şekilde yapılandığı hakkında çıkarımlar yapılmasına olanak sağlamamıştır. Nihayet geçtiğimiz yıl yayımlanmış olan iki çalışma ile ilk kez aynı anda insan genomu ve insan mikrobiyomunu inceleyerek mikrobiyomu şekillendiren genetik faktörler hakkında bulgular ortaya konmuştur. Blekman ve ark.<sup>(27)</sup> İMP’de üretilen metagenom verisi içerisinde kontaminasyon olarak bulunan insan genom dizilerini biyoinformatik yöntemler kullanarak ayıklamış ve bu bireylere ait genetik varyasyonları ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada, genom boyu ilişkilendirme yaklaşımları (GWAS) kullanılarak mikrobiyal çeşitlilik, taksonomik ünite düzeyinde farklılıklar ve mikrobiyal gen düzeyinde ilişkiler tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, metabolik/sinyal yolları seviyesinde yapılan analizde melatonin, JAK/Stat, kemokin, CXCR4, bakteri ve virus tanıma resptörleri, safra asidi sentezleme yolları vb. yollara ait genlerin mikrobiyom farklılaşması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Söz konusu çalışmayla ortaya çıkan en önemli sonuç ise, daha önceki genetik çalışmalarda kompleks hastalıklarla (kalp krizi, astım, artrit, kanser, diyabet, Alzheimer gibi) ilişkilendirilmiş insan genleri ile mikrobiyom çalışmalarında kompleks hastalıklarla ilişkilendirilmiş mikrobiyal türler arasında istatistiki ilişki gözlenmesidir. Fakat şimdiye kadar insan genomu-insan mikrobiyomu ortak incelemesine yönelik tek deney tasarımı Davenport ve ark.<sup>(28)</sup>

tarafından gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada, koloni yaşamı sürdüren Kuzey Amerikalı “Hutterite” topluluğundan 127 bireyin bağırsak mikrobiyomları 16S rRNA dizilemesiyle örneklenmiş ve genom varyasyonları tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) şeklinde genotipleme çipleriyle tespit edilerek GWAS incelemesi yapılmıştır. Bu çalışmada, mikrobiyom elamanlarıyla istatistiksel olarak ilişkili gen varyasyonları tespit edilmiştir<sup>(28,29)</sup>.

### **Metagenom boyu ilişkilendirme çalışmaları ve biyoinformatik açık**

Hastalık/sağlık durumunda mikrobiyom yapısını inceleyen metagenom çalışmaları, çok yüksek hacimdeki DNA verisinin yüksek profilli bilgisayar sistemleri ve gelişmiş biyoinformatik algoritmalar ile analizine dayanmaktadır<sup>(19)</sup>. Bu yaklaşıma göre teranükleotid (Tera base pair-Tbp) büyüklüğünü bulan toplam DNA dizileri üzerinden in silico gen tespiti yapılarak bu genler bugüne değin DNA dizilemesi yapılmış organizmaların tanımlanmış genleri ile eşlenmekte, böylece metagenomun gen ve taksonomik düzeyde profillemesi yapılmaktadır. Ancak biyoinformatik yöntemlerdeki teknik yetersizlikler nedeniyle insan mikrobiyomundaki genlerin tamamının tanımlanamamış olması, verinin önemli kısmının gözardı edilmesine neden olmaktadır. Örneğin, tip-2 diyabet ve romatoid artritin incelendiği BGI projelerinde mikrobiyoma ait genlerin %30’undan fazlasının incelenmediği raporlanmıştır. Bununla birlikte kullanılan konvansiyonel istatistiki yöntemlerin (Örn. tek gen-fenotip korelasyonu, tek taksonomik tür-fenotip korelasyonu) bazı ilişkileri tespit edecek uygunlukta olmadığı bilinmektedir. Dolayısıyla, hastalık/sağlık gruplarına ait mikrobiyom farklılıklarının daha yüksek doğrulukla tespitinde yeni nesil biyoinformatik tekniklerin (makine öğrenimi, sayısal sinyal işleme gibi) kullanılması önem kazanmaktadır<sup>(30)</sup>. Örneğin,



Wang ve ark.<sup>(31)</sup> Crohn hastalığına ait 16S rRNA verisi üzerinde makine öğrenimi yöntemleri kullanılarak aslında popülasyonda azınlıkta olan türlerin de hastalık disbiyozunda rol aldığını konvansiyonel istatistik yöntemleri kullanan, De Cruz ve ark.'nın<sup>(32)</sup> sonuçlarının aksine, mikrobiyomun hastalık tahmininde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Mikrobiyom analizine paralel biçimde, genom varyasyonlarının kantitatif özelliklerle ilişkilendirildiği GWAS çalışmalarında da konvansiyonel istatistiksel yaklaşımlar tek gen/tek SNP-kantitatif özellik korelasyonu tespitine dayanmaktadır<sup>(33)</sup>. Ancak, hastalıkla veya diğer fenotiple ilişkili genetik ilişkilerin birçoğunun epistatik (küçük etki büyüklüğüne sahip çoklu genlerin toplam büyük etki yaratması) olduğu bilinmektedir<sup>(3)</sup>. Bu durum ise konvansiyonel GWAS yaklaşımının hassasiyetinin düşük olduğu ve yalnızca etki büyüklüğü yüksek olan genetik varyasyonları tespit edebilmesi sonucunu ortaya koymaktadır. Makine öğrenimi ve veri madenciliği yaklaşımlarının kullanıldığı ve aynı anda çok sayıda genin fenotiple ilişkili varyasyon tespitinin yapıldığı son dönem çalışmalarında ise epistatik çıkarımların dahi yüksek bir istatistiksel doğruluk ile yapılabildiği görülmüştür<sup>(34,35)</sup>. Mikrobiyom elemanları da kantitatif özellikler olarak kabul edilerek genom-mikrobiyom ilişkisi GWAS yaklaşımlarına benzer şekilde değerlendirilebilir. Blekhman ve ark.<sup>(27)</sup> ve Davenport ve ark.<sup>(28)</sup> tarafından yürütülen iki çalışmada da, konvansiyonel GWAS istatistiksel yaklaşımı gözönünde bulundurulmuştur. Oysa ki insan genomu-mikrobiyom ilişkisinin hem epistatik hem de pleyotropik olduğu düşünülmektedir<sup>(36)</sup>. Bu nedenle, gelecek projeksiyonlarının genetik varyasyonlar ve mikrobiyom analizi çoklu gen etkisini gözönünde bulunduracak tekniklerin uygulanacağı bir metagenom boyu ilişkilendirme çalışması (MGWAS) biyoinformatiği üzerinde şekillenmesi kaçınılmaz görünmektedir.

## KAYNAKLAR

- [https://www.genome.gov/10001772/all-about-the-human-genome-project-hgp/]
- [http://hmpdacc.org/]
- Gibson G.** Hints of hidden heritability in GWAS. *Nat Genet* 2010; 42:558-60. <https://doi.org/10.1038/ng0710-558>
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ.** Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009; 461:747-53. <https://doi.org/10.1038/nature08494>
- Goodacre R.** Metabolomics of a superorganism. *J Nutr* 2007; 137:S259-66.
- Breznak JA, Brune A.** Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu Rev Entomol* 1994; 39:453-87. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.002321>
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI.** The human microbiome project. *Nature* 2007; 449:804-10. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Cryan JF, Dinan TG.** Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13:701-12. <https://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Van den Abbeele P, Gerard P, Rabot S, et al.** Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ Microbiol* 2011; 13:2667-80. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02533.x>
- Zhang C, Zhang M, Wang S, et al.** Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 2010; 4:232-41. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>
- Hacquard S, Garrido-Oter R, Gonzalez A, et al.** Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* 2015; 17:603-16. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>
- Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, et al.** Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 2014; 345:1048-52. <https://doi.org/10.1126/science.1254529>
- Tung J, Barreiro LB, Burns MB, et al.** Social networks predict gut microbiome composition in wild baboons. *Elife* 2015, 4. <https://doi.org/10.7554/elife.05224>
- Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ.** Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* 2013; 152:39-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.052>
- Morton ER, Lynch J, Froment A, et al.** Variation in rural African gut microbiomes is strongly shaped by parasitism and diet. *PLoS Genet* 2015; 11:e 1005658
- Hoffmann C, Hill DA, Minkah N, et al.** Community-wide response of the gut microbiota to enteropathogenic *Citrobacter rodentium* infection revealed by deep sequencing. *Infect Immun* 2009; 77:4668-78. <https://doi.org/10.1128/IAI.00493-09>
- Ehrlich SD.** The human gut microbiome impacts

- health and disease. *C R Biol* 2016; 339:319-23.  
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.04.008>
18. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* 2016; 158:52-62.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.012>
  19. Qin J, Li, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55-60.  
<https://doi.org/10.1038/nature11450>
  20. Zhang X, Zhang D, Jia H, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med* 2015; 21:895-905.  
<https://doi.org/10.1038/nm.3914>
  21. Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:18933-8.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>
  22. Leamy LJ, Kelly SA, Niefeldt J, et al. Host genetics and diet, but not immunoglobulin A expression, converge to shape compositional features of the gut microbiome in an advanced intercross population of mice. *Genome Biol* 2014; 15:552.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0552-6>
  23. Org E, Parks BW, Joo JW, et al. Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome Res* 2015; 25:1558-69.  
<https://doi.org/10.1101/gr.194118.115>
  24. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis* 2011; 13:129-34.
  25. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; 486:222-7.  
<https://doi.org/10.1038/nature11053>
  26. Goodrich JK, Waters JL, Pool AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014; 159:789-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
  27. Blekhan R, Goodrich JK, Huang K, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biol* 2015; 16:1-12.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0759-1>
  28. Davenport ER, Cusanovich DA, Michelini K, Barreiro LB, Ober C, Gilad Y. Genome-wide association studies of the human gut microbiota. *PLoS One* 2015; 10:e0140301.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140301>
  29. Davenport ER. Elucidating the role of the host genome in shaping microbiome composition. *Gut Microb* 2016; 7:178-84.  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1155022>
  30. Cai L, Wu H, Li D, Zhou K, Zou F. Type 2 diabetes biomarkers of human gut microbiota selected via iterative sure independent screening method. *PLoS One* 2015; 10:e0140827.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140827>
  31. Wang F, Kaplan JL, Gold BD, et al. Detecting microbial dysbiosis associated with pediatric Crohn disease despite the high variability of the gut microbiota. *Cell Rep* 2016; 14:945-55.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.088>
  32. De Cruz P, Prideaux L, Wagner J, et al. Characterization of the gastrointestinal microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18:372-90.  
<https://doi.org/10.1002/ibd.21751>
  33. Bush WS, Moore JH. Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol* 2012; 8:e1002822.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002822>
  34. Okser S, Pahikkala T, Airola A, Salakoski T, Ripatti S, Aittokallio T. Regularized machine learning in the genetic prediction of complex traits. *PLoS Genet* 2014; 10.11: e1004754.
  35. Hennings-Yeomans PH, Cooper GF. Improving the prediction of clinical outcomes from genomic data using multiresolution analysis. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2012; 9:1442-50.  
<https://doi.org/10.1109/TCBB.2012.80>
  36. Benson AK. Host genetic architecture and the landscape of microbiome composition: humans weigh in. *Genome Biol* 2015; 16:203.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0775-1>

# Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinden Saptanan Viral Etkenler

Rabia CAN SARINOĞLU, İmran SAĞLIK, Derya MUTLU, Betil ÖZHAK BAYSAN, Dilara ÖĞÜNÇ, Dilek ÇOLAK

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

## ÖZ

**Amaç:** Viral etkenlere bağlı santral sinir sistemi enfeksiyonları her yaşta görülebilen, akut seyirli ve hızlı ilerleyen, mortalite ve morbiditesi yüksek enfeksiyonlardır. Tanıda, nükleik asit amplifikasyon test yöntemlerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sıklıkla tercih edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü'ne viral etkenlerin PZR yöntemi ile araştırılması için gönderilen beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde elde edilen sonuçların retrospektif olarak değerlendirilmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü'ne 2010-2014 yılları arasında viral SSS enfeksiyonu ön tanısı ile gönderilen 704 hastaya ait 2849 BOS örneğinin sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. BOS örneklerinde adenovirus (AdV), sitomegalovirus (CMV), Epstein Barr virus (EBV), enterovirus (EV), herpes simplex virus tip 1 ve tip 2 (HSV-1, HSV-2) virüsleri gerçek zamanlı PZR yöntemiyle araştırılmıştır. BOS örneklerinde protein ve glukoz ölçüm değerleri kaydedilmiştir.

**Bulgular:** Otuz beş hastaya ait 38 BOS örneğinde araştırılan viral etkenler pozitif bulunmuştur. BOS örneklerinde saptanan viral etkenlerin oranları; EBV DNA, EV RNA, HSV-1 DNA, AdV DNA, CMV DNA ve HSV-2 DNA için sırasıyla %3.6 (11/308), %1.8 (8/447), %1.7 (12/721), %1 (4/405), %0.4 (1/271) ve %0.2 (2/697) olarak bulunmuştur. Bir hastada HSV-1 DNA ve EBV DNA birlikte saptanmıştır. BOS örneklerinde viral etken saptanan hastaların BOS glukoz düzeyi, 19 (%54.2) hastada normal sınırlarda, altı (%17.1) hastada düşük ve on (%28.6) hastada yüksek bulunmuştur. BOS protein düzeyi ise 17 (%48.6) hastada normal sınırlarda ve 18 (%51.4) hastada yüksek bulunmuştur.

**Sonuç:** BOS örneklerinde PZR temelli moleküler yöntemler kullanılarak olası tüm viral etkenlerin araştırılmasının erken tanı ve tedaviye olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** BOS, PZR, Viral SSS enfeksiyonu

## ABSTRACT

### Viral Agents Identified in Cerebrospinal Fluid Samples

**Objective:** Viral infections of central nervous system (CNS) are rapidly progressive, acute infections with high mortality and morbidity rates, and affect people of every age. Polymerase chain reaction (PCR), which is a nucleic acid amplification test (NAAT) is frequently used for diagnosing viral infections of CNS. The aim of this study is to retrospectively analyze the results of cerebrospinal fluid (CSF) samples, which were sent to Akdeniz University Medical Faculty Hospital, Central Laboratory, Department of Microbiology to be investigated for viral agents by PCR method.

**Material and Methods:** The results of a total of 2849 CSF samples from 704 patients, sent to Akdeniz University Hospital Central Laboratory, Department of Microbiology between 2010-2014 with a preliminary diagnosis of viral CNS infection, were retrospectively analyzed. The CSF samples were tested by the real-time PCR method for adenovirus (AdV), cytomegalovirus (CMV), Epstein Barr Virus (EBV), enterovirus (EV) and herpes simplex viruses type 1 and type 2 (HSV-1, HSV-2). Also, protein and glucose levels in CSF samples were recorded.

**Results:** Thirty eight CSF samples from 35 patients were found to be positive for viral infectious agents. EBV DNA, EV RNA, HSV-1 DNA, AdV DNA, CMV DNA and HSV-2 DNA were detected in 3.6% (11/308), 1.8% (8/447), 1.7% (12/721), 1% (4/405), 0.4% (1/271) and 0.2% (2/697) of the samples respectively. HSV-1 DNA and EBV DNA were detected in one patient simultaneously. The CSF glucose levels of the patients, who were found to be positive for viral infectious agents were within normal limits in 19 (54.2%), low in six (17.1%) and high in ten (28.6%) patients. Also normal, and higher CSF protein levels were found in 17 (48.6%) and 18 (51.4%) patients, respectively.

**Conclusion:** Using PCR based molecular methods for the investigation of all possible viral agents in CSF samples will conceivably provide opportunity for early diagnosis and therapy of viral CNS infections.

**Keywords:** CSF, PCR, Viral CNS infection

**Alındığı tarih:** 19.07.2016

**Kabul tarihi:** 20.12.2016

**Yazışma adresi:** Rabia Can Sarınoğlu, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

**e-posta:** rabiicansarinoglu@hotmail.com

## GİRİŞ

Viral santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları; menenjit, ensefalit, postenfeksiyöz ensefalomyelit ve yavaş ilerleyen nörolojik hastalıklar gibi pek çok farklı klinik tablo ile karşımıza çıkabilir. Bu klinik tablolar her yaşta görülebilir; enfeksiyonun tipine göre akut, subakut ya da kronik olabilir. Klinik seyri kendini sınırlayan enfeksiyonlardan hızlı ilerleyen mortalite ve morbiditesi yüksek enfeksiyonlara kadar farklılıklar gösterebilir<sup>(1,2)</sup>. Viral SSS enfeksiyonlarının tanısında beyin omurilik sıvısının (BOS) mikroskopik incelenmesi, spesifik viral antikorların, antijenlerin veya viral nükleik asitlerin saptanması ve hücre kültüründe virus izolasyonu gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır. Fakat her bir yöntemin kendi içinde sınırlamaları vardır. Mikroskopik inceleme çok sayıda enfekte hücre varlığında tanısal değer taşır. İntratekal üretilen antikorlar ise enfeksiyonun başlangıcından ancak 8-10 gün sonra BOS'da saptanabilir. BOS'dan hücre kültüründe virus izolasyonu, menenjit etkeni birçok viral patojenin tanısı için altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, örnek doğru zamanda alınmadığında duyarlılığı düşük, pahalı, sıkıntılı ve zaman alıcı bir tanı yöntemidir. Ayrıca Coxsackie A gibi bazı nörotropik viruslar hücre kültüründe üretilemez. Tüm bu nedenlerden dolayı son yıllarda nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) en sık kullanılan yöntem olmuştur<sup>(2-4)</sup>. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip hızlı bir yöntem olması nedeniyle birçok laboratuvar da BOS'da enteroviruslar (EV), herpes simplex virus (HSV), sitomegalovirus (CMV) ve Epstein-Barr Virus (EBV) enfeksiyonlarının tanısında tercih edilmektedir<sup>(5)</sup>.

Bu çalışmanın amacı, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü'ne PZR yöntemi ile viral etkenlerin araştırılması için gönderilen BOS örneklerinde elde edilen sonuçların retrospektif

olarak değerlendirilmesidir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü'ne Ocak 2010-Nisan 2014 tarihleri arasında viral etkenlerin PZR ile araştırılması için gönderilen 704 hastaya ait 2849 BOS örneğinin sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Hastalara ait klinik ve laboratuvar bulguları hasta dosyalarından elde edilmiştir. BOS örneklerinde Adenovirus (AdV), CMV, EBV, EV ve HSV 1-2 nükleik asitleri araştırılmıştır. CMV için nükleik asit ekstraksiyonu ve gerçek zamanlı PZR Cobas Ampliprep/COBAS Taqman (Roche, ABD) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Diğer örneklerde ise nükleik asit ekstraksiyonu EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Almanya) ile yapıldıktan sonra gerçek zamanlı PZR HSV 1-2 için Artus HSV 1-2 RG PZR (Qiagen, Almanya), AdV için LightMix Kit Human Adenovirus (TIB MOLBIOL, Almanya), EBV için Artus EBV RG PZR (Qiagen, Almanya), Enterovirus için Argene Enterovirus R-gene (BioMérieux, Fransa) kitleri ile araştırılmıştır.

BOS protein düzeyleri türbidimetrik yöntem (Cobas c502, Roche, Almanya) ile BOS glukoz düzeyleri ise heksokinaz enzimatik referans yöntemi (Cobas c701, Roche, Almanya) ile çalışılmıştır. BOS glukoz normal değeri 40-70 mg/dL, BOS protein normal düzeyi ise 15-45 mg/dL olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

BOS örnekleri çalışılan hastaların 296'sı (%42) kadın, 408'i (%58) erkek olup, ortanca yaş değeri 14.92 (yaş aralığı: 0-91 yıl) olarak bulunmuştur. Hastaların 374'ü (%53.1) çocuk, (yaş aralığı: 6 gün-18 yıl) ve 330'u (%46.9) erişkin (yaş aralığı: 19-91 yıl) yaş grubundadır. BOS örneklerinde saptanan viral etkenlerin oranları; EBV

**Tablo 1. Viral etkenlerin araştırıldığı BOS örnek sayıları, pozitiflik oranları ve hastaların demografik özellikleri.**

Viral etken	Sayı n	Pozitif n (%)	Yaş median değeri* (yaş aralığı-yıl)	Erkek* n (%)	Kadın* n (%)
HSV-1	721	12 (1.7)	14.8 (0-91)	58.6	41.4
HSV-2	697	2 (0.2)	16.0 (0-91)	58.0	41.2
EV	447	8 (1.8)	27.5 (0-91)	57.5	42.5
AdV	405	4 (1.0)	17.2 (0-85)	53.2	46.8
EBV	308	11 (3.6)	28.7 (0-85)	55.2	44.8
CMV	271	1 (0.4)	31.4 (0-82)	54.7	45.3
Toplam	2849	38 (1.3)	14.92 (0-91)	58.0	42.0

\*istatistiksel analiz hasta sayısı esas alınarak yapılmıştır.

DNA, EV RNA, HSV-I DNA, AdV DNA, CMV DNA ve HSV-2 DNA için sırasıyla %3.6 (11/308), %1.8 (8/447), %1.7 (12/721), %1 (4/405), %0.4 (1/271) ve %0.2 (2/697) olarak bulunmuştur. İki bin sekiz yüz kırk dokuz BOS örneğinde araştırılan viral etkenler ve viral etkenlerin araştırıldığı hastalara ait bazı demografik özellikler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Otuz beş hastanın BOS örneği araştırılan viral etkenler için pozitif bulunmuştur. On iki (%34.2) hastada HSV-1 DNA, sekiz (%22.8) hastada Enterovirus RNA, sekiz (% 22.8) hastada EBV DNA, dört (%11.4) hastada Adenovirus DNA, iki (%5.7) hastada HSV-2 DNA ve bir (%2.8) hastada CMV DNA pozitif bulunmuştur. Bir hastanın BOS örneğinde HSV-1 DNA ve EBV DNA birlikte pozitifdir. Viral etkenlerin aylara göre dağılımı Şekil 1’de gösterilmiştir. Dokuz (%25.7) hastada yaz, dört (%11.4) hastada sonbahar, on iki (%34.2) hastada kış, on (%28.5) hastada ilkbahar mevsimlerinde pozitiflik saptanmıştır.

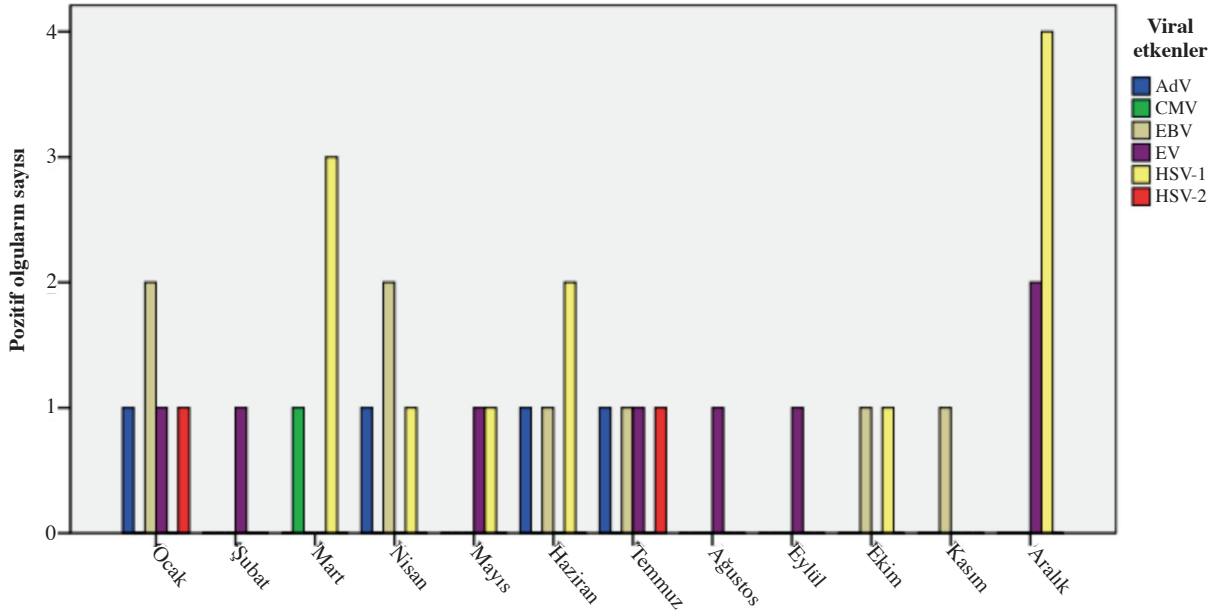
BOS örneklerinde viral etken saptanan hastaların ortanca yaş değeri 15.71 yıldır (aralık: 0-70) ve hastaların %65.8’inin cinsiyeti erkektir. Viral etkenlerin hastaların yaş gruplarına göre dağılımı Şekil 2’de gösterilmiştir. Bu hastaların 28’i (%80) viral meningoensefalit, üçü (%8.6) Guillain-Barré Sendromu, ikisi (%5.7) multiple skleroz ve transvers myelit, biri (%2.9) enflamatuvar polinöropati ve bir hasta (%2.9) ise HIV enfeksiyonu ve beyin tutulumu (lenfoma) nörolojik tanısı almıştır (Tablo 2). Hastaların 11’inde immün yetmezlik [bir böbrek nakli, bir kompozit doku nakli, bir HIV enfeksiyonu, dört malignite (lenfoid lösemi, lenfoma, aplastik ependimom ve medullablastom), iki kombine immün yetmezlik] saptanmıştır. Bu hastalarda en sık saptanan viral etken EBV’dir (n=7).

BOS örneklerinde viral etken saptanan hastaların BOS glukoz düzeyi 19 (%54.3) hastada normal sınırlarda, altı (%17.1) hastada düşük ve on (%28.6) hastada yüksek bulunmuştur. BOS protein düzeyi ise 17 (%48.6) hastada normal sınır

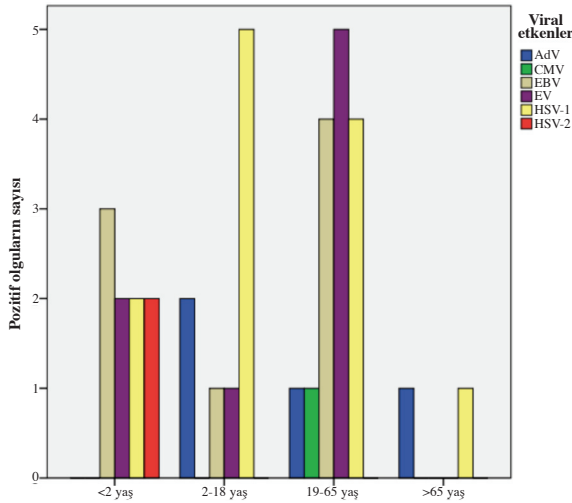
**Tablo 2. BOS’da viral etken saptanan hastaların klinik tanıları ve viral etkenlerin dağılımı.**

Tanı	Hasta sayısı (n)	AdV	CMV	EBV	EV	HSV-1	HSV-2
Akut meningoensefalit	28	3	1	5	6	11	2
Guillain-Barré Sendromu	3	1			1	1	
Multipl skleroz	2			1	1		
Enflamatuvar polinöropati	1			1			
AIDS+ Lenfoma	1			1			
Toplam	35	4	1	8	8	12	2

AdV: Adenovirus; CMV: Sitomegalovirus; EBV; Epstein Barr virus; EV: Enterovirus HSV: Herpes simplex virus



Şekil 1. Beyin-Omurilik sıvısı örneklerinde viral etken saptanan hastaların aylara göre dağılımı (2010-2014).



Şekil 2. BOS örneklerinde viral etken saptanan hastaların yaş dağılımı.

lar içinde ve 18 (%51.4) hastada yüksek bulunmuştur. BOS örneklerinin Gram boyamasında iki örnekte 3-5 polimorf nüveli lökosit görülmüştür, hiçbir örnekte bakteri üremesi saptanmamıştır.

## TARTIŞMA

SSS enfeksiyonlarında özellikle moleküler tekniklerin gelişimi ile viral etkenlerin saptanmasında artış olmuştur.

Günümüzde PZR ve ilişkili yöntemlerin akut, sporadik, fokal ensefalopatinin en yaygın etkeni olan HSV'nin tanısında etkinliği kanıtlanmıştır. Herpes viruslar aseptik menenjit ve ensefalitin en sık saptanan viral etkenleri arasındadır. BOS PZR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü HSV için %95'in üzerinde, EBV için duyarlılığı %98, özgüllüğü %100, CMV için ise duyarlılığı %82-100, özgüllüğü %86-100 oranlarındadır<sup>(2,5-9)</sup>. Çalışmamızda BOS örneklerinde saptanan herpes virusların oranları EBV, HSV-1, HSV-2 ve CMV için sırasıyla %3.6 (11/308) %1.7 (12/721), %0.3 (1/271), %0.2 (2/721) olarak bulunmuştur. Studahl ve ark.<sup>(10)</sup> viral SSS enfeksiyonu düşünülen 662 hastanın BOS örneğinde %2.87 HSV-1 DNA, %1.5 HSV-2 DNA, %3.2 EBV DNA saptamıştır. García-Bardeci ve ark.<sup>(11)</sup> yaptıkları çalışmada, 330 BOS örneğinde %1.2 (4/330) HSV-1 DNA, %0.3 (1/330) HSV-2 DNA, %0.3 (1/330) CMV DNA bulmuşlardır. Bhaskaran ve ark.<sup>(3)</sup> ise 1663 BOS örneğinde %0.9 (16/1663) HSV DNA, %0.4 (7/1663) CMV DNA ve %2.1 (35/1663) EBV DNA bulmuşlardır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, ensefalit ya da aseptik menenjit tanısı almış hastaların BOS örneklerinde saptanan HSV DNA oranı %9.7-29.4

arasındadır<sup>(12-14)</sup>. Ege Üniversitesi Hastanesi'nde yapılan retrospektif bir çalışmada, SSS enfeksiyonu ön tanılı hastaların BOS örneklerinde viral etkenler araştırılmış, toplamda 289 BOS örneğinde EBV DNA %15 (3/20), HSV DNA %2 (2/198) ve CMV DNA %1 (1/46) oranında saptanmıştır<sup>(15)</sup>.

Herpes viruslar hem immünsüpresif hem de immünkompetan hastalarda SSS'yi tutan çeşitli akut, subakut ve kronik nörolojik hastalıklarla ilişkilidir<sup>(16-18)</sup>. Çeşitli çalışmalarda da SSS'yi etkileyen nörolojik hastalıklarda herpes virus koenfeksiyonlarının olabileceği bildirilmiştir<sup>(6,19,20)</sup>. Bu çalışmada, Guillain-Barré sendromu tanısı alan bir hastanın BOS örneğinde HSV-1, beyin tutulumu olan bir AIDS hastası ile multiple skleroz ve polinöropati tanıları alan iki hastanın BOS örneğinde de EBV izole edilmiştir.

Meningoensefalite neden olan herpesviruslardan EBV, CMV, VZV ve HHV-6'nın neden olduğu SSS enfeksiyonları genellikle immünsüpresif hastalarda ortaya çıkar. EBV DNA'sı pozitif bulunan 11 BOS örneğinden yedisi (%63.6) immünsüpresif hastalara aittir. EBV enfeksiyonunda ensefalit, aseptik menenjit, transvers myelit ve Guillain-Barré sendromunu içeren birçok nörolojik tutulum bildirilmiştir. Bu klinik sendromlar tek başına ya da enfeksiyöz mononükleozun klinik tablosu ile beraber olabilir<sup>(21)</sup>. İmmünitesi normal kişilerde primer enfeksiyondan sonra enfekte hücrelerin büyük kısmı elimine edilir ve virus az sayıda B lenfositte ömür boyu latent olarak kalır. İmmün yetmezlikli hastalarda, özellikle hücrel immün yanıtın baskılandığı (AIDS, transplantasyon, X'e bağlı lenfoproliferatif hastalık) durumlarda reaktif olabilir<sup>(2)</sup>. AIDS hastalarında eşlik eden serebral bir lezyon varlığında EBV'nin BOS'da saptanmasının primer SSS lenfoması için yüksek prediktif değere sahip olduğu bildirilse de başka bir çalışmada düşük duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir<sup>(22,23)</sup>. Konağın immünsüpresif

durumuna bağlı olarak virusun reaktivasyonu ya da latent enfeksiyonu taşıyan lökositlerin intratekal boşluğa geçişiyle BOS'da EBV saptanabilir<sup>(21)</sup>. Bu çalışmada, EBV enfeksiyonlarının primer enfeksiyona mı yoksa reaktivasyona mı bağlı olduğunun ayırımı yapılamamıştır.

Çalışmamızda meningoensefalit ön tanısı alan bir çocuk hastanın BOS örneğinde HSV-1 DNA ve EBV DNA pozitif bulunmuştur. Bu hastanın serum örneğinde EBV viral kapsit antijeni (VCA) IgG sonucu pozitif, VCA IgM sonucu negatif olarak bulunmuştur. Viral SSS koenfeksiyonlarında EBV saptanmasının patogenezinde; mevcut enflamasyonun EBV reaktivasyonunu tetikleyebileceği ya da uygun primerler seçilmediği takdirde BOS'a geçen B lenfositlerinde latent virusun saptanabileceği bildirilmektedir<sup>(21,24)</sup>.

Enterovirüsler daha çok çocuklarda enfeksiyona neden olur ve nonspesifik febril tablolardan, aseptik menenjit ve aseptik ensefalite kadar değişik klinik tablolar oluşturabilir. Enteroviral menenjitin özgül virolojik tanısında BOS örneklerinde PZR yöntemi ile enterovirus saptanması, hücre kültüründe virus izolasyonundan daha duyarlıdır<sup>(25-27)</sup> ve meningoensefalite bağlı nörolojik semptomları olan hastaların tanısında önemli bir yere sahiptir<sup>(28)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda aseptik menenjit ön tanısı alan olgularda %82.6, %38.7, %63, %16.6 ve %0 oranlarında EV RNA saptandığı bildirilmiştir<sup>(29-33)</sup>. Ülkemizden bildirilen diğer çalışmalarda, BOS örneklerinde RT-PZR ile EV RNA pozitiflik oranları %1.5 ve DNA chip yöntemiyle %5'dir<sup>(25,34)</sup>. Çalışmamızda bu oran %1.8 olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda, BOS örneklerinde EV RNA saptanan sekiz hastanın üçü çocuk yaş grubunda, beşi erişkin yaş grubundadır. Pozitif örneklerin ikisi yaz, biri sonbahar, dördü kış ve biri ilkbahar mevsiminde saptanmıştır. EV enfeksiyonla-

rının yaz ve erken sonbahar aylarında arttığı bilinmektedir<sup>(35-37)</sup>. Bununla birlikte, kış aylarında olgularda artış olduğu bildirilen yayınlar da bulunmaktadır<sup>(38,39)</sup>. Çalışmamızda, yılın tamamında bir dağılım görülmekle birlikte, yaz ve kış aylarında pikler gözlenmiştir. Olgu sayımının az olmasının ve bulunduğumuz bölgenin iklim özelliklerinin buna neden olabileceğini düşünüyoruz.

Viral menenjit ve ensefalitlerde BOS glukoz düzeyi normal, protein düzeyi ise normal ya da hafif yüksek saptanabilir<sup>(2)</sup>. Çalışmamızda, benzer şekilde BOS örneklerinde viral etken saptanan hastaların %54.3'ünde BOS glukoz düzeyi normal sınırlarda ve BOS protein düzeyi ise %48.6 hastada normal sınırlar içindeyken, %51.4 hastada hafif yüksek bulunmuştur.

Viral SSS enfeksiyonlarına çok farklı virus neden olabilmekte, bu da tanı ve tedavide önemli sorunlara yol açabilmektedir. Viral SSS enfeksiyonlarının kliniği virusa özgü olmadığı için klinik bulgular tanıda yol gösterici değildir. Elde edilmesi oldukça zahmetli olan BOS'da olası tüm etkenlerin araştırılması erken tanı ve tedaviye olanak sağlamaktadır. Bu çalışmada, viral etkenlerin tümünün aynı örnekte eşzamanlı olarak çalışılmamış olması çalışmamızın bir sınırlılığıdır. Ancak, ekonomik nedenler ve farklı klinik yaklaşımlar buna neden olmuştur. Multipleks PZR temelli moleküler yöntemlerle yapılacak ileri çalışmaların bu soruna çözüm getirebileceği düşünülebilir.

## KAYNAKLAR

1. **Smalling TW, Sefers SE, Li H, Tang YW.** Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2317-22. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2317-2322.2002>
2. **Us AD.** Viral santral sinir sistemi enfeksiyonları. Us AD, Ergünay K (Eds), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2012: 271-94.
3. **Bhaskaran A, Racska L, Gander R, Southern P, Cavuoti D, Alatom A.** Interpretation of positive

- molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77:236-40. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.017>
4. **Chadwick DR.** Viral meningitis. *Br Med Bull* 2006; 75-76:1-14. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh057>
  5. **Delbue S, Tremolada S, Ferrante P.** Application of molecular tools for the diagnosis of central nervous system infections. *Neurol Sci* 2008; 29(Suppl 2):S283-5. <https://doi.org/10.1007/s10072-008-0965-7>
  6. **DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Weinberg A, Tyler KL.** Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002; 25(Suppl 1):S5-11. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(02\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00028-8)
  7. **Tebas P, Nease RF, Storch GA.** Use of the PCR in the diagnosis of herpes simplex encephalitis: a decision analysis model. *Am J Med* 1998; 105:287-95. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(98\)00259-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(98)00259-9)
  8. **Boivin G.** Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; 11(Suppl 2):48A-56A.
  9. **Bestetti A, Pierotti C, Terreni M, et al.** Comparison of three nucleic acid amplification assays of cerebrospinal fluid for diagnosis of cytomegalovirus encephalitis. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1148-51. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1148-1151.2001>
  10. **Studahl M, Hagberg L, Rekdar E, Bergström T.** Herpesvirus DNA detection in cerebral spinal fluid: differences in clinical presentation between alpha-, beta-, and gamma-herpesviruses. *Scand J Infect Dis* 2000; 32:237-48. <https://doi.org/10.1080/00365540050165857>
  11. **Garcia-Bardeci D, Pena MJ, Suárez-Bordón P, Aladro Y, Pérez-González C, Lafarga B.** Value of the polymerase chain reaction in the diagnosis of herpes infections of the nervous system. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:150-5.
  12. **Sayiner A, Oktem M, Ergani A, Ergon C, Kurul S, Abacioglu YH.** Detection of herpes simplex virus DNA and enterovirus RNA in cerebrospinal fluid using PCR and microplate or strip hybridization assay. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9(Suppl 1):S410-9.
  13. **Zeytinoglu A, Altuglu I, Saymer A, ve ark.** Herpes ensefalitinin beyin omurilik sıvısı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. *FLORA* 2000; 5:179-82.
  14. **Altuglu I, Zeytinoglu A, Sirin H, Yuceyar N, Erensoy S.** Comparison of different polymerase chain reaction methods for detection of herpes simplex virus types 1 and 2 encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:669-71. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0202-3>
  15. **Soylar M, Altuglu I, Sertöz R, Aydın D, Akkoyun F, Zeytinoglu A.** Ege Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran santral sinir sistemi enfeksiyonu olgularında saptanan viral etkenler. *Ege Tıp Derg* 2014; 53:65-70.
  16. **Gaeta A, Verzaro S, Cristina LM, Mancini C, Nazari C.** Diagnosis of neurological herpesvirus infections:real time PCR in cerebral spinal fluid analysis. *New Microbiol* 2009; 32:333-40.
  17. **Kleinschmidt-DeMasters BK, DeBiasi RL, Tyler KL.** Polymerase chain reaction as a diagnostic adjunct



- in herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol* 2001; 11:452-64.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2001.tb00414.x>
18. Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol* 2001; 11:440-51.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2001.tb00413.x>
  19. Cinque P, Cleator GM, Weber T, Monteyne P, Sindic CJ, van Loon AM. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. EU Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61:339-45.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp.61.4.339>
  20. Studahl M, Ricksten A, Sandberg T, et al. Cytomegalovirus infection of the CNS in non-compromised patients. *Acta Neurol Scand* 1994; 89:451-7.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1994.tb02665.x>
  21. Doja A, Bitnun A, Ford Jones EL, et al. Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year review. *J Child Neuro* 2006; 21:384-91.
  22. Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993; 342:398-401.  
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92814-A](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92814-A)
  23. Ivers LC, Kim AY, Sax PE. Predictive value of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid for detection of Epstein-Barr virus to establish the diagnosis of HIV-related primary central nervous system lymphoma. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1629-32.  
<https://doi.org/10.1086/420934>
  24. Weinberg A, Bloch KC, Li S, et al. Dual infections of the central nervous system with Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 2005; 191:234-7.  
<https://doi.org/10.1086/426402>
  25. Kılıç I, Altuğlu İ, Çiçek C, ve ark. Santral sinir sistemi enfeksiyonu etkeni enterovirusların RT-PCR ve hücre kültürü yöntemleri ile saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:468-77.
  26. Rotbart HA. Viral meningitis and the aseptic meningitis syndrome. In: Scheld WM, Whitley RJ, Durack DT eds. *Infections of the Central Nervous System*. 2th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:23-46.
  27. Sawyer MH, Holland D, Aintablian M. Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:177-82.  
<https://doi.org/10.1097/00006454-199403000-00002>
  28. Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer MH. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA* 2000; 283:2680-5.  
<https://doi.org/10.1001/jama.283.20.2680>
  29. Akman S, Özkaya E, Çolak D, Daloğlu H. A hospital outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type 30 in Antalya, Turkey. *Türk J Pediatr* 2002; 44:237-9.
  30. Saymer AA, Oktem IMA, Ergani A, Ergon C, Kurul S, Abacıoğlu YH. Detection of herpes simplex virus DNA and enterovirus RNA in cerebrospinal fluid using PCR and microplate or strip hybridization assay. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9(Suppl 1):410.
  31. Guney C, Özkaya E, Yapar M, Gumus I, Kubar A, Dogancı L. Laboratory diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system by using a nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47:557-62.  
[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00148-2)
  32. Özkaya E, Uysal G, Atak T, Alkan M. 2001-2004 yılları arasında aseptik menenjit ön tanılı pediatrik olgulardan izole edilen enterovirüs serotiplerinin dağılımı. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39:43-51.
  33. Deniz E. Aseptik menenjitli hastaların BOS örneklerinde enterovirüs ve herpesvirüslerin hücre kültürü ve PCR yöntemleri ile araştırılması. [Tıpta Uzmanlık tezi] Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2006.
  34. Karakadioğlu S. Aseptik menenjit ve kardit etyolojisinde enteroviruslerin chip tekniği (Microarray) ile araştırılması. [Uzmanlık Tezi] Manisa: Celal Bayar Üniversitesi, 2007.
  35. Dumaidi K, Frantzidou F, Papa A, Diza E, Antoniadis A. Enterovirus meningitis in Greece from 2003-2005: diagnosis, CSF laboratory findings, and clinical manifestations. *J Clin Lab Anal* 2006; 20:177-83.  
<https://doi.org/10.1002/jcla.20129>
  36. El Hiar R, Haddad S, Jaïdane H, et al. Enteroviral central nervous system infections in children of the region of monastir, Tunisia: diagnosis, laboratory findings of cerebrospinal fluid and clinical manifestations. *Indian J Virol* 2012; 23:294-302.  
<https://doi.org/10.1007/s13337-012-0104-1>
  37. Hyeon JY, Hwang S, Kim H, et al. Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human enterovirus, South Korea, 1999-2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:1268-75.  
<https://doi.org/10.3201/eid1908.130496>
  38. Tao Z, Wang H, Li Y, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus associated with aseptic meningitis in Shandong Province, China, 2006-2012. *PLoS One* 2014; 9:e89766.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089766>
  39. Murina EA, Ivanova MV, Osipova ZA, Mukomolova AL. Clinical laboratory characteristics of serous meningitides in Saint Petersburg. *Arkh Patol* 2010; 72:32-4.

# Viral Solunum Yolu Enfeksiyonlarının Tanısında Bir Multipleks PCR Yönteminin Performansının Değerlendirilmesi<sup>§</sup>

Ayşe ARSLAN\*, Candan ÇİÇEK\*, Eylem Ulaş SAZ\*\*, Figen GÜLEN\*\*, Haydar SOYDANER KARAKUŞ\*\*\*

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

\*\*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

\*\*\*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

## ÖZ

**Amaç:** Çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin saptanmasında konvansiyonel yöntemlerle ["shell vial" hücre kültürü yöntemi, direkt floresans antikor (DFA)] multipleks polimerize zincir tepkimesi (PCR) test yöntemi- ni karşılaştırmak ve multipleks PCR testinin performansını değerlendirmek amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, Ocak 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında solunum yolu enfeksiyonu tanılı 502 [217 (%43.2) kadın, 285 (%56.8) erkek] nazofarengeal sürüntü örneği incelendi. Solunum virüslerinin saptanmasında, DFA ve "shell vial" hücre kültürü yöntemi altın standart olarak alındı. Multipleks PCR testi için, üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

**Bulgular:** Değerlendirilen hastaların 238'inde (%47.4) en az bir yöntemle solunum virüsleri pozitif bulundu. İncelenen 502 örneğin 189'u (%37.6) DFA ve shell vial hücre kültürü yöntemi ile pozitif [human metapneumovirus (HMPV), human coronavirus (HCoV), human rhinovirus (HRV), human bocavirus (HBoV) ve parainfluenza virüs tip 4 (PIV 4) hariç], 233'ü (%46.4) multipleks PCR ile pozitif bulundu. Yalnızca HMPV, HCoV, HRV, HBoV ve PIV 4'ün pozitif olduğu 37 örnek, DFA ve shell vial hücre kültürü ile saptanamadığı için karşılaştırma dışı bırakıldı. Hücre kültürü ve DFA'ya göre multipleks PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV ve test geçerlilik oranları sırasıyla %97.3, %95.7, %93.9, %98.1 ve %96.3 olarak bulundu.

**Sonuç:** Solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda sırasıyla en sık saptanan solunum virüsleri respiratory sinsitial virüs (RSV), HRV ve influenza virüs tip A (INF A) olmuştur. Multipleks PCR'in duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksek bulunmuştur. Multipleks PCR'in DFA ve hücre kültürü yöntemleriyle saptanamayan 37 solunum virüsünü de tanımlayabildiği görülmüştür. Multipleks PCR'in yüksek duyarlılık ve özgüllüğe nedeniyle rutin laboratuvar kullanımına uygun olduğu öngörülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Multipleks PCR, solunum virüsleri, solunum yolu enfeksiyonu

## ABSTRACT

**Evaluation of the Performance of a Multiplex PCR Method for the Diagnosis of Viral Respiratory Tract Infections**

**Objective:** In this study, we aimed to compare multiplex PCR (mPCR) assay with conventional methods [direct fluorescent antibody (DFA) test and shell vial cell culture] for the detection of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infection and to evaluate the performance of the multiplex PCR method.

**Materials and Methods:** Between January 2012 and August 2013, nasopharyngeal swab specimens collected from 502 [43.2% female, 285 (56.8% male)] patients with acute respiratory tract infection were analyzed. Shell vial cell culture and DFA were used as a gold standard method for the detection of respiratory viruses. Multiplex PCR test was performed according to the manufacturer's instructions.

**Results:** Two hundred and thirty-eight (47.4%) patients were positive for respiratory viruses as detected by at least one method. Among 502 specimens analyzed, 189 (37.6%) were positive using the combination of DFA and shell vial cell culture [excluding human metapneumovirus (HMPV), human coronavirus (HCoV), human rhinovirus (HRV), human bocavirus (HBoV), parainfluenza virus type 4 (PIV 4)], and 233 (46.4%) were positive by mPCR. Thirty-seven samples were excluded from the comparison, because HMPV, HCoV, HRV, HBoV, PIV 4 could not be detected by DFA and shell vial cell culture. The overall sensitivity, specificity, positive, and negative predictive value, and diagnostic accuracy of mPCR were 97.3, 95.7, 93.9, 98.1 and 96.3%, respectively.

**Conclusion:** Respiratory syncytial virus (RSV), HRV and influenza virus type A (INF A) were the most frequently identified respiratory viruses in patients with respiratory tract infections. The sensitivity and specificity of mPCR were found to be quite high. Additionally mPCR could identify 37 respiratory viruses that DFA and cell culture could not. As the mPCR method was found to have high sensitivity and specificity, it was predicted to be suitable for use in routine laboratories.

**Keywords:** Multiplex PCR, respiratory viruses, respiratory tract infections

**Alındığı tarih:** 16.06.2015

**Kabul tarihi:** 19.12.2016

**Yazışma adresi:** Ayşe Arslan, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**Tel:** (0232) 390 30 20

**e-posta:** aysa\_demir@hotmail.com

<sup>§</sup> Bu çalışma II. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde (9-13 Kasım 2013, Antalya) poster bildiri olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Akut solunum yolu enfeksiyonu insanlarda en sık görülen hastalıklardan biridir. Erişkinlerde özellikle bağışık yetmezlikli hastalarda ve çocuklarda önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre tüm yaş grupları incelendiğinde solunum sistemi hastalıkları en sık ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada (%9.67) yer alırken, hastaneye yatış nedenleri arasında ilk sırada (%12.8) yer almaktadır<sup>(1)</sup>. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2012 yılı raporuna göre 5 yaş altı çocuklarda en sık ölüm nedenleri arasında beşinci sırada (%8) yer alır<sup>(2)</sup>.

Akut solunum yolu enfeksiyonlarının en sık nedeni virüslerdir. Yaklaşık olarak 20'den fazla virüs türünün akut solunum yolu enfeksiyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu virüslerden en sık karşılaşılan; respiratuar sinsityal virüs(RSV), adenovirus (ADV), influenza virüs tip A ve B (INF A/B), parainfluenza virüs tip 1-3 (PIV 1-3), human rhinovirus A/B (HRV A/B), enterovirus (EV), human coronavirus (HCoV) gibi klasik solunum virüslerine yeni solunum virüsleri olan human bocavirus (HBoV), human metapneumovirus (HMPV) de eklenmiştir<sup>(3)</sup>. Gereksiz antibiyotik kullanımını önlemek, gerekli antiviral ilacı kullanabilmek, nozokomiyal bulaş riskini en aza indirmek, hastalığın yayılımı ve engellenmesi konusunda erken bilgi vermek ve hasta yönetiminde gereksiz mali kaybı önlemek için solunum yolu enfeksiyonlarının etiyolojik tanısını koymak çok önemlidir<sup>(4)</sup>. Bu yüzden viral solunum yolu enfeksiyonlarının hızlı, duyarlı ve geçerli bir yöntemle kısa sürede tanımlanması gerekir.

Son dekatta, solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan solunum virüslerinin hepsini tek bir örnekte ve tek bir test ile aynı anda tespit edebilen nükleik asit saptama prensibine dayanan çok sayıda multipleks PCR yöntemi geliştirilmiştir.

PCR yönteminin klasik yöntemler olan hücre kültürü ve direkt floresan antikor testi (DFA)'nden daha kısa sürede sonuç verdiği ve daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bazı yeni solunum virüsleri yalnızca PCR yöntemi ile saptanmakta, hücre kültürü yöntemi ve DFA ile saptanamamaktadır<sup>(4)</sup>.

Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin saptanmasında konvansiyonel yöntemlerle (shell vial hücre kültürü yöntemi ve DFA) multipleks PCR test yöntemi karşılaştırmak ve multipleks PCR testinin performansını değerlendirmek amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ocak 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'na solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile gönderilen 502 nazofarengeyal sürüntü örneği incelendi. Örnekler arşiv materyalleriydi ve laboratuvar sisteminde solunum yolu enfeksiyonu tanısı olanlar çalışmaya dâhil edildi. Sistemdeki tanılar esas alındığı için enfeksiyonun akut, kronik veya alt, üst ayrımı yapılamadı. Çalışma kapsamına alınan 502 [217 (%43.2) kadın, 285 (%56.8) erkek] örneğin 467 (%93)'si çocuk, 35 (%7)'i erişkin hastalardan elde edildi. Nazofarengeyal sürüntü örneklerine; DFA, shell vial hücre kültürü ve multipleks PCR yöntemi aynı anda uygulandı. Hastaların yaş aralığı 5 gün ile 87 yaş (medyan: 1 yaş) arasındaydı. Nazofarengeyal sürüntü örnekleri santrifüjlendikten sonra, dipteki çökeltiden DFA, süpernatandan hücre kültürü ve multipleks PCR testleri yapıldı.

**DFA testi:** Dipteki çökeltiden alınan 100 µl örnek, 1000 g'de, 5 dakika hücre santrifüjünde çevrildi. Lamlar, -20°C'de, 10 dakika asetonda fikse edildikten sonra "fluorescein isothiocyana-

te” (FITC) ile işaretlenmiş poliklonal antikor (Respiratory Viral Screen and Identification DFA Kit, Millipore, Light Diagnostic, ABD) ile boyandı. Preparatlar CO<sub>2</sub>’li etüvde 37°C’de, 30 dakika, nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi. Süre sonunda preparatlar floresan mikroskopisinde incelendi. Üç veya daha fazla floresan veren hücre görülen örnekler pozitif olarak kabul edildi. Pozitif bulunan örnekler, RSV, INF A/B, PIV 1-3 ve ADV monoklonal antikorları ile yukarıda tanımlandığı gibi yine boyanarak tiplendirildi.

**Hücre kültürü:** Klinik örnekler hücre dizilerine “shell vial” yöntemi ile ekildi. Her örnek için HEP-2 (RSV), Vero (PIV 1-3), A-549 (ADV) ve iki MDCK (INF A/B) (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Almanya-Vero hücre dizisi, Şap Enstitüsü, Ankara) hücre dizisinden oluşan beş adet shell vial tüpü hazırlandı. Süpernatandan alınan örnek, 0.45 µm por çapında filtreden geçirilerek her hücre dizisine 0.2 ml hacminde inoküle edildikten sonra tüpler 3200 g’de, 35°C’de, 30 dakika santrüflendi. Tüpler, 37°C’de 1 saat bekletildi ve daha sonra hücre dizileri üstündeki sıvı atılarak yerine 1 ml hacminde izolasyon besiyeri (Biochrom AG, Leonorenstr, Almanya) ilave edildi. Tüpler, 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’li ve nemli ortamda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüplerden kültür sıvısı uzaklaştırıldı ve “shell vial”ler -20°C’de, 10 dakika asetonda fikse edildi. HEP-2 hücre dizisine inoküle edilen örnek RSV, A-549 hücre dizisi ADV, Vero hücre dizisi PIV 1-3, MDCK hücre dizilerinin biri INF A, diğeri tip INF B’ye özgül FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikor (Millipore, Light Diagnostic, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda boyandı<sup>(5,6)</sup>. Preparatlar floresan mikroskopisinde incelendi. Bir veya daha fazla floresan veren hücre görülen örnekler pozitif kabul edildi.

**Multipleks PCR:** Süpernatandan, üretici firma-

nın önerileri doğrultusunda nükleik asitler ekstrakte edildi (Viral DNA/RNA Extraction Kit, iNtRON, Güney Kore). Ekstraksiyon işleminden sonra, revers transkripsiyon ile cDNA’lar sentezlendi (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits, Fermentas, ABD). İçeriğinde; solunum virüslerine özgül DPO primerleri, DNA polimeraz enzimi, dNTPs, mastermiks, 8-MOP çözümü bulunan “RV15 ACE Screening” [INF A ve B, RSV A/B, ADV, PIV 1-4, HBoV, HMPV, HRV A/B, HCoV OC43, 229E/NL63] (Seegene, Güney Kore) kiti kullanılarak ısı döngü cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda 40 döngü yapıldı ve cDNA’lar çoklu amplifiye edildi. Amplifiye ürün tam otomatize “Screen Tape” çoklu tanımlama cihazına yüklendi. Bu cihazda, PCR ürününe mini poliakrilamid jellerde otomatize jel elektroforezi yapıldı ve sonuçlar “RV15 ACE Screening Software”i kullanılarak belirlendi.

## BULGULAR

Bu çalışmada solunum yolu enfeksiyonu tanısı almış hastalardan yaklaşık iki yıllık sürede laboratuvara gönderilen 502 nazofarengeyal sürüntü örneği incelendi. Çalışmada, hücre kültürü ve DFA yöntemlerinin her ikisinin sonuçları ile multipleks PCR test yönteminin sonuçları karşılaştırıldı. Uygulanan testlerin tümünün sonuçlarına göre, örneklerin 238’i (%47.4) pozitif, 264’ü (%52.6) negatif bulundu (Tablo 1). Hücre kültürü ve DFA yöntemlerinin her ikisinin sonucuna göre 189 (%37.6) örnek pozitif, 313 (%62.4) örnek negatif; multipleks PCR testi ile 233 (%46.4) örnek pozitif, 269 (%53.6) örnek negatif bulundu. Hücre kültürü ve DFA ile yalnızca klasik solunum virüsleri (RSV, INF A/B, PIV 1-3, ADV) saptanabildiği için klasik yöntemlerle saptanamayan diğer solunum virüslerinin tek başına pozitif olduğu 37 örnek karşılaştırma dışı bırakıldı. Ayrıca, hücre kültürü ve DFA ile saptanmayan diğer solunum virüsleri ile birlikte çoklu etkenler arasında yer alan 15

**Tablo 1. Solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin dağılımı\*.**

Grup	Virüsler	Toplam n (%)
Tek etken enfeksiyonu	RSV	110 (21.9)
	HRV	30 (6.0)
	INF A	26 (5.2)
	INF B	7 (1.4)
	ADV	10 (2.0)
	PIV 1	1 (0.2)
	PIV 2	1 (0.2)
	PIV 3	14 (2.8)
	PIV 4	1 (0.2)
	HMPV	3 (0.6)
	EV	1 (0.2)
	HCoV	1 (0.2)
	İkili etken enfeksiyonu	RSV + HRV
RSV+ADV		5 (0.2)
RSV+PIV 1		2 (0.4)
RSV+PIV 3		2 (0.4)
RSV+INF A		6 (1.0)
RSV+INF B		1 (0.2)
RSV+HMPV		1 (0.2)
HRV+PIV 3		1 (0.2)
HRV+ADV		1 (0.2)
HRV+EV		1 (0.2)
INF A+ADV	1 (0.2)	
Üçlü etken enfeksiyonu	RSV+HRV+HMPV	1 (0.2)
	RSV+HRV+HCoV	1 (0.2)
	RSV+HRV+HBoV	1 (0.2)
Pozitif		238 (47.4)
Negatif		264 (52.6)
<b>Toplam</b>		<b>502</b>

\*Hücre kültürü, DFA ve multipleks PCR test yöntemlerinden en az biriyle pozitif saptanan sonuçlar verilmiştir. RSV: Respiratuar sınırsız virüs; ADV: Adenovirus; INF A/B: İnfluenza virüs tip A ve B; PIV 1-3: Parainfluenza virüs tip 1-3; HRV A/B: Human rhinovirus A/B; EV: Enterovirus; HCoV: Human coronavirus; HBoV: Human bocavirus; HMPV: Human metapneumovirus

örneklerdeki klasik solunum virüsleri karşılaştırma kapsamına alındı (Tablo 2). Hücre kültürü ve DFA'ya göre multipleks PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV ve test geçerlilik oranları sırasıyla %97.3, %95.7, %93.9, %98.1 ve %96.3 olarak bulundu.

Solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda RSV %21.9, HRV %6.0 ve INF A %5.2 oranında pozitif bulundu. Hastaların %6.6'sında çoklu etken enfeksiyonu görüldü. En fazla RSV ve HRV birlikteliği görüldü. Hücre kültürü ve/veya DFA ile pozitif bulunan 5 örnek [RSV, INF B,

**Tablo 2. Hücre kültürü/DFA yöntemi ile multipleks PCR yönteminin karşılaştırılması.**

Multipleks PCR	+	-	Toplam
+	184	12	196
-	5	264	269
Toplam	189	276	465

DFA: Direkt floresan antikor

ADV, INF A (n=2)] multipleks PCR ile negatif bulundu. Multipleks PCR ile pozitif bulunan 12 [RSV(n=4), INF A (n=2), ADV, INF A+RSV (n=4), ADV+RSV] örnek ise hücre kültürü ve/veya DFA ile negatif bulundu.

## TARTIŞMA

Virüsler solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan etkenlerin başında yer alır. Viral solunum yolu enfeksiyonları sağlıklı erişkinlerde hafif klinik tablo ile seyrederken, özellikle yaşlılarda, immun yetmezlikli kişilerde ve çocuklarda ciddi morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilir. Bu yüzden viral solunum yolu hastalıklarının doğru ve hızlı tanısı, gerekli tedaviyi uygulamak, enfeksiyon bulaşını sınırlamak ve gereksiz antibiyotik kullanımını engellemek ve buna bağlı olarak da diğer bakteriyel etkenlerin direnç kazanmasını önlemek için gereklidir<sup>(7)</sup>.

Solunum virüslerini saptamada kullanılan konvansiyonel yöntemler hücre kültürü (tüp kültürü, shell vial) ve DFA testleridir. Solunum virüslerinin saptanmasında hücre kültürü altın standart yöntem olmasına karşın olumsuz transport koşullarından testin etkilenmesi, her etken için ayrı hücre dizisi hazırlama gerekliliği, kısıtlı sayıda etkeni belirleyebilmesi, test süresinin 48 saatte sonuçlanması gibi dezavantajları bulunmaktadır. DFA ise yaklaşık bir saatlik sürede sonuçlanabilmesine rağmen, örnek kalitesinden testin etkilenmesi ve hücre kültürüne göre duyarlılığının daha düşük olması kullanımını sınırlamaktadır<sup>(4,8,9)</sup>. Shell vial hücre kültürü ve

DFA ile solunum yolu enfeksiyonlarının büyük bir bölümünü oluşturan, RSV, INF A/B, ADV, PIV saptanabilmektedir. Ancak, HCoV, HMPV, HBoV, PIV 4 gibi virüsler de önemli etkenler arasındadır. Human coronavirus, HRV ve HMPV hücre kültüründe geç ve güç üretilibildikleri için, HBoV ise hücre kültüründe üremediği için bu solunum virüsleri yalnızca nükleik asit testleri ile saptanabilmektedir<sup>(8)</sup>.

Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu tanılı hastalarda solunum virüslerinin saptanmasında konvansiyonel yöntemlerle (shell vial hücre kültürü yöntemi ve DFA) multipleks PCR test yöntemini karşılaştırılarak, multipleks PCR testinin performansı değerlendirilmiştir. Tüm testlerin toplam sonuçlarına bakıldığında incelenen 502 nazofarengeyal sürüntü örneğinin yaklaşık %48'i pozitif bulunmuştur. Hücre kültürü ve DFA ile örneklerin %37.6'sı, multipleks PCR testi ile %46.4'ü pozitif bulunmuştur. Hücre kültürü ve DFA ile yalnızca klasik solunum virüsleri (RSV, INF A/B, PIV 1-3, ADV) saptanabildiği için klasik yöntemlerle saptanamayan diğer solunum virüslerinin tek başına pozitif olduğu 37 örnek karşılaştırma dışı bırakılmıştır. Hücre kültürü ve DFA ile negatif bulunan 12 örnek [RSV(n=4), INF A (n=2), ADV, INF A+RSV (n=4), ADV+RSV] multipleks PCR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Hücre kültürü ve DFA ile pozitif bulunan 5 örnek de [RSV, INF B, ADV, INF A (n=2)] multipleks PCR ile negatif bulunmuştur. Her iki yöntem karşılaştırıldığında pozitif bulunan tekli etkenler neredeyse birbirine benzer olmakla birlikte, multipleks PCR'in ikili etkenleri saptamada hücre kültürü ve DFA'ya üstün olduğu görülmüştür. Bu çalışma retrospektif olarak gerçekleştirilmiş ve test yinelemeleri yapılamamıştır. Bu yüzden "yanlış pozitif" yorumu yapılamamıştır. Ancak genel olarak bakıldığında hücre kültürü ve DFA ile en çok RSV'nin saptanamadığı görülmüştür. Diğer solunum virüslerine göre RSV ısı farklılıklarından en fazla etkilenen virüstür<sup>(10)</sup>. Bu da hastane-

mizde transport koşullarında bazı sorunlar olduğunun göstergesidir. Multipleks PCR yöntemi de en fazla influenza virüslerini saptamada yetersiz kalmıştır.

RSV (%21.9), HRV (%6.0) ve INF A (%5.2) solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda sırasıyla en sık saptanan solunum virüsleri olmuştur. Hastaların %6.6'sında çoklu etken enfeksiyonu görülmüştür. Daha önce laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmanın verileri ile bu çalışma sonuçları benzer bulunmuştur<sup>(11)</sup>. Çoklu etkenlerin azımsanmayacak oranda olduğu ve klasik yöntemlerin çoklu etkenleri saptamada yetersiz olduğu görülmektedir. Ayrıca çoklu etkenlerin önemli bir bölümünden sorumlu olan HRV'nin konvansiyonel yöntemlerle saptanamaması da bu yöntemler için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Hücre kültürü ve DFA'ya göre multipleks PCR yönteminin duyarlılığı %97.3, özgüllüğü %95.7, PPV %93.9, NPV %98.1 ve test geçerlilik oranı %96.3 olarak bulunmuştur. Daha önce yapılan araştırmalarda olduğu gibi bu çalışmada da multipleks PCR yönteminin klasik yöntemlerden daha duyarlı olduğu görülmüştür<sup>(8,12,13)</sup>. Multipleks PCR'in daha duyarlı olmasının yanı sıra hızlı ve doğru sonuç vermesi de klinik ve epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. Hızlı sonuç; öncelikle influenza salgını gibi durumlarda gerekli antiviral tedaviye başlamak, gereksiz antibiyotik kullanımını önlemek, gerektiğinde nozokomiyal bulaşı engellemek için damlacık izolasyon önlemlerini almak, tanı koymak için ileri ve gereksiz tetkikleri yapmamak, saptanan virüsle ilgili halk sağlığı ile ilgili bilgileri vermek açısından son derece önemlidir<sup>(13)</sup>.

Multipleks PCR testinin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu testle, hücre kültürü ve DFA'dan farklı olarak tek etken enfeksiyonlarında 37, çoklu etken enfeksiyonlarında ise tek başına iki, klasik solunum virüsleri-

ne ek patojenlerin saptanmasında 14 hastada daha pozitif bulunarak sonuçlara katkıda bulunmuştur.

Sonuç olarak, multipleks PCR'nın klasik yöntemlerle tespit edilemeyen virüsleri de saptayabildiği, klasik yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç verdiği, örnek kalitesinden etkilenmediği, duyarlı ve özgüllüğünün yüksek olduğu, aynı anda birden fazla örnek çalışılabildiği için iş yükünü de azalttığı görülmüştür. Bu nedenle multipleks PCR yönteminin rutin kullanıma uygun olduğu öngörülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. TC Sağlık Bakanlığı. Sağlık İstatistikleri Yıllığı. 2012; 49-56.
2. **World Health Organization.** Global Health Observatory (GHO) data. World Health Organization, 2012. [http://www.who.int/gho/countries/tur.pdf] (Erişim tarihi: Haziran 2015).
3. **Tsukagoshi H, Ishioka T, Noda M, Kozawa K, Kimura H.** Molecular epidemiology of respiratory viruses in virus-induced asthma. *Front Microbiol* 2013; 4:278 .  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00278>
4. **Pérez-Ruiz M, Pedrosa-Corral I, Sanbonmatsu-Gámez S, Navarro-Marí M.** Laboratory detection of respiratory viruses by automated techniques. *Open Virol J* 2012; 6:151-9.  
<https://doi.org/10.2174/1874357901206010151>
5. **Wiedbrauk DL, Johnston SLG.** Manuel of clinical virology. Raven Press, New York, ABD, 1993.
6. **Çiçek C.** Hücre kültürü teknikleri: Tek tabaka hücre kültürlerinin üretilmesi ve idame ettirilmesi. In: Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT (ed). Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı. Vol 3, 3rd ed (Çeviri). [Clinical Microbiology Procedures Handbook In: Garcia LS, Isenberg HD, 3rd, ASM Press, Washington DC, 2007] Ankara: Atlas kitapçılık; 2014: 10.3.1-10.3.9
7. **Kim SR, Ki CS, Lee NY.** Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* 2009; 156:111-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.11.007>
8. **Ginocchio CC, McAdam AJ.** Current best practices for respiratory virus testing. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9 Suppl):S44-8.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00698-11>
9. **Ecemiş T, Yılmaz Ö, Şanlıdağ T, Akçalı S, Yüksel H.** Üst solunum yolu enfeksiyonlu çocuklarda viral etkenlerin multipleks PCR ile araştırılması. *Behcet Uz Çocuk Hast Derg* 2012; 2:1-5.
10. **Schlaudecker EP, Heck JP, MacIntyre ET, et al.** Comparison of a new transport medium with universal transport medium at a tropical field site. *Diagn Microb Infect Dis* 2014; 80:107-10.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.018>
11. **Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, ve ark.** Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin prevalansı. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:188-200.  
<https://doi.org/10.5578/mb.9024>
12. **Balada-Llasat JM, LaRue H, Kelly C, Rigali L, Pancholi P.** Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode®-PLx, and xTAG® respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. *J Clin Virol* 2011; 50:42-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.09.022>
13. **Mahony JB.** Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:716-47.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00037-07>

# Konya İlinde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Suşlarının Birinci Seçenek Anti-tüberküloz İlaçlara Direnç Oranları<sup>§</sup>

Fatma ESENKAYA TAŞBENT\*, Metin DOĞAN\*\*

\*Konya Halk Sağlığı Laboratuvarı, Konya

\*\*Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, 2014 ve 2015 yılını içeren iki yıllık süreçte, laboratuvarımızda izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının birinci seçenek anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının retrospektif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Tüberküloz ön tanısı ile gönderilen şüpheli örnekler Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanarak, mikroskopik olarak değerlendirilmiş, Löwenstein-Jensen besiyeri ve otomatize kültür sistemine (Mycolor TK, Salubris A.Ş., İstanbul) ekimleri yapılmıştır. Üreme görülen kültür tüplerinde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks tanımlaması ve streptomisin, izoniazid, rifampisin, etambutol duyarlılıkları çalışılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmaya laboratuvara gönderilen 5406 klinik örnekten, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izole edilmiş 266 suş dâhil edilmiştir. Her hasta için tek bir suş çalışmaya alınmıştır. Streptomisin, izoniazid, rifampisin ve etambutole toplam direnç oranları sırasıyla %4.5, %6.4, %9 ve %4.5 olarak bulunmuştur. Hastaların %83.1'i tüm antibiyotiklere duyarlı olup, antimikobakteriyel ilaçlar içinde en yüksek direnç rifampisin için saptanmıştır. Çok ilaca direnç oranı ise %2.6 olarak bulunmuştur. Çalışmada ayrıca Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile otomatize kültür sistemi sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

**Sonuç:** Tüberkülozda direnç paternlerinin izlenmesi, uygulanacak tedavi protokollerinin belirlenmesinde önemli olduğu gibi uzun vadede direnç gelişiminin önlenmesinde de yararlı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, antitüberküloz duyarlılığı, direnç

## ABSTRACT

**Resistance Rates of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains to the Primary Anti-tuberculosis Drugs in Konya Province, Turkey**

**Objective:** In this study we aimed to retrospectively analyse primary anti-tuberculosis drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains, isolated from patients with initial diagnosis of tuberculosis during the two years period between 2014 and 2015 at our laboratory.

**Material and Methods:** Clinical samples obtained from patients with suspected tuberculosis were stained with Ehrlich-Ziehl-Neelsen method and evaluated microscopically. After processing of samples, each sample was inoculated onto Löwenstein-Jensen medium and automated culture system (Mycolor TK, Salubris A.Ş., İstanbul) medium. If bacterial growth was detected, *Mycobacterium tuberculosis* complex typing was made and if requested antituberculosis drug susceptibilities for streptomycin, isoniazid, rifampicin and ethambutol were tested.

**Results:** Out of 5406 clinical samples sent to the laboratory, a total of 266 *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates were included in the study and only single sample from each patient was processed. Total resistance rates to streptomycin, isoniazid, rifampicin, and ethambutol were 4.5%, 6.4%, 9% ve 4.5%, respectively. Among antimycobacterial drugs, the highest resistance rate was found for rifampicin and 83.1% of the patients were susceptible to all of the agents tested. Multidrug resistance was determined as 2.6 percent. In the study, automated culture system was also evaluated in comparison with Ehrlich-Ziehl-Neelsen staining method.

**Conclusion:** Monitoring of resistance patterns in tuberculosis is important in determining treatment protocols and will also be useful in preventing the development of resistance in long term.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, antituberculosis susceptibility, resistance

**Alındığı tarih:** 04.10.2016

**Kabul tarihi:** 02.01.2017

**Yazışma adresi:** Fatma Esenkaya Taşbent, Sakarya Mah. Kamera Sok. No: 9 Konya

**Tel:** (0332) 223 12 73

**e-posta:** fesentas@hotmail.com

<sup>§</sup> Bu araştırma VII. Mikobakteri Sempozyumu'nda (08-10 Mayıs 2015, Mersin) poster bildiri olarak sunulmuştur. Poster bildiride, 2014 yılı verileri sunulmuş olup, çalışmaya 2015 yılı verileri eklenerek bu araştırma hazırlanmıştır.



## GİRİŞ

Tarihin en eski hastalıklarından biri olan tüberkülozun etkeni *Mycobacterium tuberculosis* 1882’de Robert Koch tarafından bulunmuştur. Bu buluş tüberküloz hastalığı ve hastaları için bir devrimdir. *Bacterium tuberculosis* adı ile anılan bakteri, koloni morfolojisi ve yavaş üreme özelliği nedeni ile mantara benzetildiğinden Lehman ve Neuman tarafından 1886 yılında *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. Bu tarihten sonra tanı yöntemleri gelişmiş, 20 Kasım 1944’te Waksman’ın streptomisini keşfi ile tüberkülozda antibiyoterapi dönemi başlamıştır. Günümüzde hâlâ tek mikroorganizmanın yaptığı en çok öldüren bulaşıcı hastalıktır<sup>(1)</sup>.

Direkt sürüntü örneğinde Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyası ile aside dirençli bakteri (ARB) varlığının mikroskopik olarak araştırılması ve kültür, hastalığın teşhisinde temel yöntemlerdir<sup>(2)</sup>. Mikroskopi ile aside dirençli basillerin saptanması, tüberkülozun laboratuvar tanısında ve bulaştırıcı olguları saptamada en önemli yöntemlerden biridir. Kültür ise altın standart olarak kabul edilmektedir. Tanıda mikroskopik inceleme ile kültürün birlikte değerlendirilmesi gerekir. Kültür için, yumurta bazlı veya agar içerikli katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Hızlı tanı sağlayabilmek amacıyla sıvı besiyerlerinin otomatize ve yarı otomatize cihazlarda kullanıldığı çeşitli sistemler geliştirilmiştir<sup>(3)</sup>.

Modern tanı, tedavi ve kontrol yöntemlerine rağmen tüberküloz halen önemli halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) her yıl yayınladığı küresel tüberküloz raporları ile hastalara ait verileri dünya, bölgeler ve ülkeler bazında ortaya koymaktadır. DSÖ’nün 2015 yılı raporlarına göre, 2014 yılında 9.6 milyon yeni tüberküloz olgusu olduğu sanılmaktadır. Yine aynı yılda tüberkülozdan 1.5 milyon kişi yaşamını kaybetmiştir. Erken teşhis

ve doğru tedavi ile neredeyse tüm tüberküloz olguları tedavi edilebilirken bu rakam kabul edilemeyecek kadar yüksektir<sup>(4)</sup>. Türkiye Verem Savaş 2014 raporunda ülkemizdeki toplam olgu sayısı, 2005 yılı için 20535, 2012 yılı için 14691 olarak bildirilmiştir. DSÖ’nün son yayımlanan raporuna göre 2014 yılı için toplam tüberküloz olgu sayısı 13378’e gerilemiştir. 2003 yılında 100000 de 26 olan insidans 2014 yılında 18 olarak raporlanmıştır. Türkiye’de tüberküloz insidansı yıllar içinde düşüş göstermekle birlikte, ülkemiz tüberküloz insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır<sup>(4,5)</sup>. Bugün tüberküloz ilaç direnci verisi DSÖ tarafından 153 ülkede sistematik olarak toplanıp analiz edilmektedir. Ancak, tüm tüberküloz hastalarına rutin ilaç direnci testi uygulamasına dayalı ilaç direnci sürveyansı 80 ülkede yürütülmektedir<sup>(4,6)</sup>.

Birinci seçenek anti-tüberküloz (anti-TB) ilaçları; izoniazid (INH), rifampisin (RIF), Etambutol (EMB), Streptomisin (SM)’dir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi ve DSÖ tarafından tüberkülozun başlangıç tedavisinde birinci seçenek ilaçların kombine kullanımı önerilmektedir. Ancak, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de birinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç önemli bir sorundur<sup>(7)</sup>. Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB); diğer anti-TB ilaçlara direnç varlığında ve/veya yokluğunda en azından INH ve RIF dirençli *M. tuberculosis* olarak tanımlanmaktadır.

Anti-TB ilaçlarla karşılaşmamış olan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) izolatları klinik olarak dirençli değildir. Tüberküloz basillerinde direnç, doğal olarak direnç genlerinin varlığına veya spontan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Bakteriler arası gen aktarımı yoluyla direnç oluşmamaktadır. Plazmitlere bağlı direnç tanımlanmamıştır. Doğal direnç olasılığı: RIF için 10-8, INH ve EMB için 10-6 , SM için 10-5, INH+ RIF için 10-14, INH+RIF+EMB için 10-20 kadardır.

İlaça dirençli suşların ortaya çıkışı, antibiyotiklerin hatalı kullanımıyla alakalıdır. Çoğul ilaca dirençli suşlar, adım adım direncin birikimiyle ortaya çıkmaktadır: ÇİD-TB insan yapımıdır<sup>(8)</sup>. Türkiye Verem Savaş 2014 raporuna göre, ülkemizdeki 2012 yılında ÇİD-TB oranı yeni olgular için %3.2, önceden tedavi görmüş olgularda %21.8, tüm olgulardaki oran ise % 5.4 olarak bildirilmiştir<sup>(5)</sup>.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole ve identifiye edilen MTK suşlarının, birinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç durumunun retrospektif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Ocak 2014-Aralık 2015 tarihlerini içeren iki yıllık süreçte, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Bölge Tüberküloz Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen MTK suşlarının birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlılıkları, retrospektif olarak incelenmiş, ayrıca EZN tanı yöntemiyle otomatize sistem kültür sonuçları karşılaştırılmıştır. Mikobakteri yönünden incelemek amacı ile laboratuvara gönderilen balgam, bronş lavaj sıvısı (BAL), akciğer dışı abse aspirat sıvısı, trakeal aspirat, idrar gibi klinik örnekler dekontaminasyon ve konsantrasyondan sonra beyin-omurilik sıvısı, eklem sıvısı, plevra sıvısı, perikard sıvısı, doku biyopsi örneği, asit gibi aseptik koşullarda toplandığı düşünülen vücut sıvıları ise dekontamine edilmeden konsantrasyondan sonra ekimleri yapılmış ve eşzamanlı olarak EZN boyama için de preparatlar hazırlanmıştır. Örneklerin dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemleri Mycoprosafe (Salubris A.Ş., İstanbul) hazır ticari kitleri kullanılarak yapılmıştır. Tüberküloz ön tanısı ile gelen örnekler üretici firmanın önerileri doğrultusunda sıvı bazlı otomatize kültür sistemine (Mycolor TK, Salubris AŞ, İstanbul) ve Löwenstein-Jensen besiyerine ekilmiştir.

Hızlı bir tüberküloz tanı sistemi olan TK kültür sistemi hızlı tüberküloz tanı sistemidir ve son yıllarda geliştirilmiştir. Çoklu renk indikatörlerinin kimyasal olarak reaksiyonuna dayanan TK besiyeri, izolasyonda kullanılmaktadır ve mikobakterilerin üremesini erken sürede saptayabilmektedir. TK besiyerinin orijinal rengi kırmızıdır. Ekilen örnekte mikobakteri varlığında, mikobakterilerin ürettiği metabolitler ve enzimlerle TK besiyerinin rengi sarıya, bakteriyel veya fungal türlerin üremesi durumunda ise yeşile değişmektedir. Sistem içinde yer alan TK MEDIUM tüpü sarı renge dönüştüğünde test sonlandırılmıştır. TK PNB kırmızı kalmıyorsa bu mikobakteri türü MTK grubuna ait, her ikisi de sarı renge dönmüşse tüberküloz dışı bir tür olarak tanımlanmıştır. Otomatize sistemde üreyen MTK izolatları TK ANTI TB & PNB KIT sistemine inoküle edilmiş ve SM, INH, RIF, EMB duyarlılıkları çalışılmıştır. İlaç son konsantrasyonları; INH için 0.2 µg/ml, RIF için 1.0 µg/ml, SM için 2.0 µg/ml ve EMB için 7.5 µg/ml olarak ayarlanmıştır. TK MEDIUM sarı renge dönüştüğünde antimikobakteriyel antibiyotik içeren herhangi bir tüp sarıya dönmüşse izolat dirençli, kırmızı kalmış ise duyarlı kabul edilmiştir<sup>(9,10)</sup>.

## BULGULAR

İki yıllık süreçte laboratuvarımıza gönderilen 5406 klinik örnekten 363'ünde MTK suşu izole edilmiş ve her hasta için tek bir suş çalışmaya alındığında, 266 suş çalışmaya dâhil edilmiştir. 2014 ve 2015 yılının hem ayrı ayrı analizleri hem de toplamdaki direnç oranları hesaplanmıştır. 2014 yılında izole edilen 113 suş içinde; SM, INH, RIF, EMB dirençleri sırasıyla %5.3 %5.3; %8.8 ve % 3.5 olarak izlenirken, 2015 yılı için ise direnç oranları sırasıyla %3.9, %7.2, %9.2 ve %5.2 olarak bulunmuştur. İki yıllık genel direnç oranlarına baktığımızda SM direnci %4.5, INH direnci %6.4, RIF direnci %9, EMB direnci %4.5 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1. Anti-TB ilaç duyarlılık sonuçları.

YILLAR	2014 Sayı (%)	2015 Sayı (%)	2014-2015 Sayı (%)
<b>Test edilen izolat</b>	113 (100)	153 (100)	266 (100)
<b>Birinci seçenek ilaçlara duyarlı</b>	92 (%81.4)	129 (%84.3)	221 (%83.1)
<b>Herhangi bir ilaca direnç</b>	21 (%18.6)	24 (%15.7)	45 (%16.9)
SM	6 (%5.3)	6 (%3.9)	12 (%4.5)
INH	6 (%5.3)	11 (%7.2)	17 (%6.4)
RIF	10 (%8.8)	14 (%9.2)	24 (%9)
EMB	4 (%3.5)	8 (%5.2)	12 (%4.5)
<b>Tek ilaca direnç</b>	18 (%15.9)	13 (%8.5)	31 (%11.7)
SM	4 (%3.5)	2 (%1.3)	6 (%2.3)
INH	3 (%2.7)	3 (%2)	6 (%2.3)
RIF	8 (%7.1)	6 (%3.9)	14 (%5.3)
EMB	3 (%2.7)	2 (%1.3)	5 (%1.9)
<b>Çok ilaca direnç (ÇİD)</b>	2 (%1.8)	5 (%3.2)	7 (%2.6)
INH+RIF	0 (%0)	2 (%1.3)	2 (%0.8)
INH+RIF+EMB	1 (%0.9)	1 (%0.7)	2 (%0.8)
INH+RIF+SM	1 (%0.9)	1 (%0.7)	2 (%0.8)
INH+RIF+EMB+SM	0 (%0)	1 (%0.7)	1 (%0.4)
<b>Diğer direnç patternleri</b>	1 (%0.9)	6 (%3.9)	7 (%2.6)
INH+EMB	0 (%0)	2 (%1.3)	2 (%0.8)
INH+SM	1 (%0.9)	1 (%0.7)	2 (%0.8)
RIF+EMB	0 (%0)	2 (%1.3)	2 (%0.8)
RIF+SM	0 (%0)	1 (%0.7)	1 (%0.4)
EMB+SM	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
INH+EMB+SM	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
RIF+EMB+SM	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

INH: izoniazid, RIF: rifampisin, EMB: etambutol, SM: streptomisin, ÇİD: Çoklu ilaç direnci

ÇİD-TB oranı ise 2014 ve 2015 yılı için toplamda %2.6 olarak bulunmuştur. Hastaların %83.1'i tüm antibiyotiklere duyarlı olup, dirençte en yüksek oran RIF için (%9) için saptanmıştır. Hastalardan dördünde, üç ilaca birden direnç tespit edilirken, bir hasta birinci seçenek anti-TB ilaçların dördüne de dirençli bulunmuştur (Tablo 1).

Çalışmaya dâhil edilen klinik örneklerden 2862'sinde EZN boyama yöntemi ile otomatize kültür sonuçları karşılaştırılmıştır. Çalışmada 2862 örneğin 187'si (%6.5) EZN yöntemi ile, 210'u ise (%7.3) Mycolor TK otomatize kültür yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Kültür pozitifliğine göre EZN'nin duyarlılığı %85.7, özgüllüğü %99.7 bulunmuştur. Kültür pozitifliğine göre EZN'nin pozitif prediktif değeri %96.2, negatif prediktif değeri %98.9 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. EZN ve otomatize kültür sonuçlarının karşılaştırılması.

	Mycolor TK (+)	Mycolor TK (-)	Toplam
<b>EZN (+)</b>	180	7	187
<b>EZN (-)</b>	30	2645	2675
<b>Toplam</b>	210	2652	2862

(+): Pozitif (-): Negatif

## TARTIŞMA

Tüberküloz tarih boyunca tedavisi için uğraşılan bir hastalıktır. İlk olarak MÖ 4. yüzyılda Hipokrat tarafından tanımlanmıştır. SM'nin keşfedildiği 1944 yılına kadar istirahat, diyet, göğüs yakıları, semptomlara yönelik tedaviler, soğuk ve taze dağ havası ile klimatoterapi, kuvvetli beslenme ve kuvvetli egzersiz gibi tedavi önerileri uygulanmıştır. Antitüberküloz tedavilerde dönüm noktası 1944'te SM'nin devreye girmesi ile yaşanmıştır. Bu ilacın keşfi Nobel ile ödüllendi-

rilmiş ancak kısa süre sonra görülen nüksler hekimlere tüberkülozda ilaç direncini öğretmiştir. 1950'nin başlarında INH ve izleyen yıllarda pirazinamid, tiasetazon, etionamid, protionamid ve EMB bulunmuştur. Bu keşifler ile tedaviler ayaktan yapılmaya başlanmıştır. Kemoterapideki son devrim 1966'da RIF'nin kullanıma girmesi olmuştur. Bu keşif şu anda da uygulanmakta olan kısa süreli tedavinin yolunu açmıştır<sup>(11)</sup>.

Şu anda dünyada olduğu gibi Türkiye'de de birinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç önemli bir sorundur. Tüberküloz tedavisinde yetersiz ve/veya yanlış uygulamalar anti-TB ilaçlara karşı dirençli MTK suşlarının artmasına neden olmaktadır.

Sağlık Bakanlığı'nca yayımlanan "Türkiye'de Verem Savaşı 2014 Raporu"nda ülkemizdeki 2005-2012 yıllarındaki direnç oranları INH için %11.5-15.4; RIF için %6.7-6.6; EMB için %4.0-5.4; SM için %8.1-11.3 olarak verilirken ÇİD-TB oranı %5.1-5.4 olarak verilmiştir. Bu verilerde en yüksek direnç oranına sahip olan birinci seçenek anti-TB ilaç INH'dır<sup>(5)</sup>. Çalışmamızda, izole edilen suşlarda bulunan direnç oranları, INH için %6.4, RIF için %9, SM için %4.5, EMB için %4.5 olarak tespit edilmiştir. ÇİD-TB oranı %2.6 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda birinci seçenek anti-TB ilaçlar içinde en yüksek direnç RIF için saptanmış olup, Türkiye verileriyle uyumlu değildir. Yapılan çalışmalarda RIF dirençli suşların çoğunun çok ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda ise, RIF direnci saptanan 24 hastanın 14'ünde RIF direnci tek başına tespit edilmiştir. RIF direncinin erken saptanması, tedavinin yönlendirilmesinde önemli olabilir. RIF direnci, RNA polimeraz enziminin beta alt birimini oluşturan gendeki mutasyonlar ile ortaya çıkar<sup>(12)</sup>.

Tuncer ve ark.<sup>(13)</sup> 2001 ile 2008 yılları arasındaki sekiz yıllık süreci içeren çalışmalarında, Konya bölgesinin anti-TB ajanlara karşı direnç profille-

rini irdelemişlerdir. Bu yıllarda Konya bölgesinde buldukları direnç oranları INH için %11.7, RIF için %5.7, SM için %5.2, EMB için %4.9 dur. Aynı çalışmada ÇİD-TB oranı ise %4 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızla karşılaştırdığımızda, bölgemizde RIF direncinin yıllar içinde önemli miktarda arttığı söylenebilir. Konya ilinden Kurtoğlu ve ark.'nın<sup>(14)</sup> 2009-2011 yılları içinde izole ve 70 MTK suşunu dâhil ettikleri başka bir çalışmada, çalışmamızın aksine, birinci seçenek anti-TB ilaçlar içinde en düşük düzey direnci RIF için bildirmişlerdir. Kurtoğlu ve ark.'nın<sup>(14)</sup> çalışmasında, INH direnci %24, SM direnci %20, RIF direnci %4, EMB direnci %6 olarak bildirilmiştir. Tuncer ve ark.'nın<sup>(13)</sup> çalışması ile Kurtoğlu ve ark.'nın<sup>(14)</sup> çalışmasında, BACTEC MGIT-960 otomatize sistem kullanılırken, çalışmamızda Mycolor TK otomatize sistem kullanılmıştır. Aynı bölgeye ait çalışmalar arasındaki uyumsuzluk nedenleri; çalışılan örnek sayısının az olması, farklı hastanelerden yapılan bildirimler olması nedeniyle hasta profilinin farklı olması ve duyarlılık çalışması için farklı otomatize sistemlerin kullanılması olabilir. Ayrıca son yıllarda eklenen Suriyeli hastaların varlığı, bölgedeki direnç profilini etkilemiş olabilir. Çalışmamızla uyumlu olarak Bozdağ ve ark.'nın<sup>(15)</sup> çalışmasında, antibiyotik duyarlılıkları Mycolor TK otomatize sistem ile belirlenmiş ve bu çalışmada da en yüksek direnç oranı RIF için bildirilmiştir. Diğer yandan Öz ve ark.'nın<sup>(10)</sup> 2004 ile 2011 yılları arasında izole edilen suşlarla yaptıkları çalışmada, duyarlılık testleri için Ocak 2004-Ekim 2008 tarihleri arasında BACTEC 460 TB ve Ekim 2008-Ekim 2011 tarihleri arasında ise Mycolor TK otomatize kültür sistemleri kullanılmıştır. Bu çalışmada, duyarlılık testlerinin Mycolor TK otomatize sistem ile çalışıldığı dönemde RIF direncinde bir artışın olmadığı belirtilmiştir. Baykal ve ark.<sup>(16)</sup> dört farklı yöntemle antimikobakteriyel duyarlılık çalışmışlardır. Çalışmada altın standart olarak kabul edilen agar proporsiyon yöntemi ile MGIT, BacT/ALERT, Mycolor TK otomatize

sistem sonuçları karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçlarında TK anti-TB sistemiyle duyarlılık saptamada özgüllük, duyarlılık ve genel uyum sırasıyla %98, %100, %98 ve kappa değeri 0.93 hesaplanmış ve kusursuz uyuma sahip bulunmuştur. Bununla birlikte Mycolor TK otomatize sistem ile bölgemizde, tespit edilen yüksek RIF direnç oranları, bu otomatize sistem ile karşılaştırmalı çalışmaların yapılması gerekliliğini düşündürmektedir.

Yaptığımız çalışmada, birinci kuşak anti-TB ilaçlara direnç oranlarını değerlendirmekle beraber, tanıda kullanılan iki yöntem karşılaştırılmıştır. Tüberkülozda mikroskopi ve kültür en temel tanı yöntemleridir. Mikroskopik inceleme özellikle tüberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelerde özgüllüğü yüksek olan ve çoğu laboratuvar tarafından tercih edilen ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Mikroskopi yalnızca potansiyel bulaştırıcı olguları bulmamızı değil aynı zamanda tedavinin etkinliğinin izlenmesini de sağlar. Bu amaçla kullanılan EZN boyama yöntemi kolay bir yöntemdir. Ancak kültüre göre özgüllüğü %98'den fazla olmasına rağmen, duyarlılığı balgamın kalitesine, içerdiği bakteri miktarına, uygulanan tekniğe, teknisyenin yetkinlik ve yeterliliğine bağlı olarak %25 ile %65 arasında değişir<sup>(3,17)</sup>. Yaman ve ark.<sup>(18)</sup> benzer bir çalışmada, EZN yönteminin kültüre göre özgüllüğünü %98, duyarlılığını ise % 47 olarak bulmuşlardır. EZN ve kültür sonuçlarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada, özgüllük %99.6, duyarlılık ise %46.8 bulunmuştur<sup>(19)</sup>. Türkiye'de Verem Savaşı 2014 raporlarına göre Türkiye geneli EZN ile ARB saptama oranı yeni olgularda %58, önceden tedavi görmüş olgularda %72.3 olarak rapor edilmiştir<sup>(5)</sup>. Çalışmamızda ise özgüllük %99.7 bulunurken, duyarlılık ise yapılan benzer çalışmalardan daha yüksek (%85.7) bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma ile bölge verileri hakkında yol gösterici olduğunu düşündüğümüz mikobakteriyoloji laboratuvarımızdaki tüberkü-

loz direnç oranları verilmiştir. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kültür işlemi duyarlılığının mikroskopik incelenmeden fazla olduğu, ancak kültür işlemleri sonuçlanana kadar hastaların erken tanı ve takibinde mikroskopik incelemenin rutin işlem olarak kültür ile değerlendirilmesi gereklidir. Direnç patternlerinin her bölge yada hastane için düzenli izlenmesinin, tüberkülozda yanlış ilaç kullanımı ve buna bağlı ortaya çıkan çoklu dirençlerin önlenmesine yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. **Seber E.** Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg* 2010; 24(Ek 2):E52-60.
2. **Negi SS, Khan SF, Gupta S, Pahsa ST, Khare S, Lal S.** Comparison of conventional diagnostic modalities, BACTEC culture and PCR test for diagnosis of tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23:29-33. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.13869>
3. **Özbey N, Akçalı A, Tatman-Otkun M.** Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi 2009-2011 yılı Tüberküloz Laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2012; 69:149-54.
4. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (Erişim tarihi: 22 Eylül 2016).
5. Türkiye'de Verem Savaşı 2014 Raporu, T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, 2014.
6. **Sezen F, Albayrak N, Özkara Ş, ve ark.** Ulusal Tüberküloz Laboratuvar Sürveyansına İlk Adım; Ankara, 2011. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:143-55. <https://doi.org/10.5578/mb.9170>
7. **Babacan F, Hasdemir U.** Mycobacterium tuberculosis kompleks, "Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds.) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere göre Enfeksiyonlar Cilt 2, 3. baskı", Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008; 2283-2302.
8. **Durmaz R.** Mycobacterium tuberculosis'de direnç sorunu. *ANKEM Derg* 2005; 19:107-10.
9. **Baylan O, Kisa O, Albay A, Doganci L.** Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8:772-7.
10. **Öz Y, Aslan M, Akşit F, Durmaz G, Kiraz N.** Mycobacterium tuberculosis Kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 2012; 26:20-4.
11. **Otkun M.** Tüberküloz tedavisinde temel ilkel ve direnç sorunu. *KLİMİK Derg* 2001; 14:71-82.
12. **Kocagoz T, Saribas Z, Alp.** Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43:6015-9.

- <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6015-6019.2005>
13. **Tuncer İ, Türk Dağı H, Solgun G, ve ark.** Konya Bölge Tüberküloz Laboratuvarı'nda 2001-2008 yılları arasında soyutlanan mikobakteri suşlarının birinci seçenek anti-tüberküloz ilaçlara direnci. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 2012; 42:27-31.
  14. **Kurtoğlu MG, Keşli R, Terzi Y, Baykan M.** Investigation of the susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains to major antituberculosis drugs with BACTEC MGIT 960 system. *Nobel Med* 2011; 7:42-8.
  15. **Bozdağ İ, Coşar AD, Uysal EB, Özer A.** Klinik örneklerden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının antibiyotiklere direnci. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2015; 13:6-10.  
<https://doi.org/10.18827/etad.83712>
  16. **Baykal ES, Güdücüoğlu H, Yaman G, Berktaş M.** Van yöresinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört farklı yöntemle antimikobakteriyel ajanlara duyarlılık tespiti. *Tuberk Toraks* 2014; 62:122-30.  
<https://doi.org/10.5578/tt.7323>
  17. **WHO.** Laboratory Services in Tuberculosis Control, Part I: Organization and Management, WHO/TB/98.258, WHO, Geneva, 1998.
  18. **Yaman G, Parlak M, Demirel M, Güdücüoğlu H, Berktaş M.** Çeşitli klinik örneklerin EZN boyama ve tüberküloz kültür sonuçlarının değerlendirilmesi. *Ortadoğu Tıp Dergisi* 2012; 4:19-22.
  19. **Kurtoğlu MG, Yüksekkaya Ş, Özdemir M, Baysal B.** Bir eğitim ve araştırma hastanesinin mikobakteriyoloji laboratuvarında direkt preparat ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması. *Selçuk Üniv Tıp Derg* 2011; 27:69-72.

# İnfluenza Referans Laboratuvarı 2015-2016 Grip Sürveyansı Verileri

Sevim MEŞE, Aysun UYANIK, Serkan ASAR, Ali AĞAÇFIDAN, Osman Şadi YENEN

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmunoloji Bilim Dalı, İstanbul

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi, İnfluenza Referans Laboratuvarı'nın 2015-2016 İnfluenza Sürveyansı bulgularının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Ulusal İnfluenza Sürveyansı kapsamında İstanbul Tıp Fakültesi, Viroloji ve Temel İmmunoloji Bilim Dalı İnfluenza Referans Laboratuvarı'na gönderilen nazal sürüntü örneklerinde İnfluenza virüsleri real-time PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** 2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda 20. hafta itibarı ile toplam 2024 burun sürüntü örneği incelenmiştir. İncelenen örneklerin 610 (%30)'unda İnfluenza saptanmıştır. İnfluenza pozitif örneklerin 319 (%52)'u İnfluenza A (H1N1) pdm09, 201 (%33)'i İnfluenza A H3N2 ve 90 (%15)'i İnfluenza B olarak tiplendirilmiştir.

**Sonuç:** Sürveyans çalışmaları, gribin toplum sağlığı üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması ve grip ile mücadele yollarının belirlenmesi açısından oldukça önem taşımaktadır. Bulgularımıza göre 2015-2016 grip sezonunda 51.-17. haftalar aktivitenin görüldüğü zamanlar olarak belirlenirken pik dönemi 3. haftada İnfluenza A (H1N1) pdm09 baskınlığında yaşanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** İnfluenza virüsleri, sürveyans, 2015-2016

## ABSTRACT

**Influenza Surveillance Data of Influenza Reference Laboratory for 2015-2016 Flu Season**

**Objective:** In this study evaluation of 2015-2016 influenza surveillance results of Influenza Reference Laboratory of Istanbul University, Medical Faculty was aimed.

**Material and Methods:** Influenza viruses in nasal swab samples, which were sent to the Influenza Reference Laboratory in Istanbul University, Medical Faculty Virology and Basic Immunology Division within the context of the Influenza Surveillance, were investigated using real-time PCR method.

**Results:** A total 2024 nasal swab samples were investigated at the Influenza Reference Laboratory at the 20<sup>th</sup> week of 2015-2016 flu season. Influenza virus was detected in 610 (30%) of the investigated samples. Three hundred and nineteen (52%) positive samples were identified as influenza A (H1N1) pdm09, 201 (33%) as influenza A H3N2 and 90 (15%) as influenza B.

**Conclusion:** Surveillance studies are extremely important for unveiling the effects of flu on public health and determining the methods for fighting against flu. According to our results the 17-51<sup>th</sup> weeks in 2015-2016 flu season were determined to be the activation time, while the peak period occurred in the 3<sup>rd</sup> week with influenza A (H1N1) pdm09 dominancy.

**Keywords:** Influenza viruses, surveillance, 2015-2016

## GİRİŞ

Orthomyxoviridae familyası içerisinde sınıflandırılan İnfluenza virüslerinin, antijenik özelliklerine göre A, B, C olmak üzere üç tipi vardır. İnfluenza A virüsü, yapısında yer alan hemaglutinin ve nöraminidaz glikoproteinlerine bağlı olarak farklı alt tipleri ile epidemilerin yanı sıra

pandemilere de yol açabilmektedir. Dolaşımda Yamagata ve Victoria olarak adlandırılan 2 farklı soy şeklinde bulunan İnfluenza B virüsü ise mevsimsel grip etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. İnfluenza C virüsü, dolaşımda tek bir soy hâlinde bulunur ve sporadik enfeksiyonlara neden olur<sup>(1,2)</sup>. İnfluenza virüsleri toplum sağlığını tehdit eden özellikleri nedeni ile 1952 yılın-

**Alındığı tarih:** 27.11.2016

**Kabul tarihi:** 23.12.2016

**Yazışma adresi:** Sevim Meşe, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmunoloji Bilim Dalı, Çapa / İstanbul

**e-posta:** drsevimmeşe@gmail.com

dan beri DSÖ tarafından izlenmektedir. Türkiye’de influenza sürveyans çalışmaları, 2005 yılında Sağlık Bakanlığı öncülüğünde Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi’ne bağlı Ulusal Viroloji Referans Merkez Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmunoloji BD (İTFVBD) bünyesindeki İnfluenza Referans Laboratuvarı aracılığı ile yürütülmeye başlatılmıştır<sup>(3,4)</sup>.

2015-2016 influenza sürveyansı kapsamında İnfluenza Referans Laboratuvarı, Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Edirne, Kırklareli, İstanbul illerine hizmet vermiştir. Söz konusu illerde influenza benzeri hastalık (ILI) olgularından gönderilen burun sürüntü örneklerinde influenza virüsü araştırılmıştır. 2015-2016 grip sezonunda THSK, şiddetli akut solunum yolu enfeksiyonları (SARI) sürveyans çalışmalarını da başlatmış bulunmaktadır. Bu kapsamda, sentinel olarak İstanbul ili Bakırköy Sadi Konuk Hastanesi’nden ve nonsentinel olarak Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Edirne, Kırklareli illerinden laboratuvarımıza gönderilen SARI olgularına ait örneklerde influenza virüsleri ile birlikte 21 solunum yolu virüsü araştırılmıştır. Bu çalışmada, 2015-2016 influenza sürveyansı kapsamında İnfluenza Referans Laboratuvarı verilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

2015-2016 influenza sürveyansı kapsamında nazal sürüntü örnekleri Virocult (Medical Wire Equipment CO, İngiltere) viral taşıma besiyeri içerisinde İnfluenza Referans Laboratuvarına gönderilmiştir. Laboratuvarda örneklerin uygunluğu kontrol edildikten sonra gerekli kayıt işlemleri yapılarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Sürüntü örneğinin Virocult içerisindeki besiyerine geçmesi ve homojenizasyonu amacıyla yapılan vorteksleme işleminden sonra 2 ml minimal essential medium (MEM) besiyeri içerisinde

kriyotüpe aktarılmıştır. Laboratuvarın yoğunluğuna göre 48 saat içerisinde çalışılacak örnekler +4°C’de bekletilirken, daha uzun süre bekletilecek örnekler -20°C’de saklanmıştır. Örneklerle uygulanan tüm işlemler güvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir.

Nazal sürüntü örneğinden viral RNA ekstraksiyonu EZ1 Virus Mini Kit V 2.0 (QIAGEN, Almanya) ile otomatik sistemde üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi için EZ1 Advanced XL (QIAGEN, Japonya) cihazı kullanılmıştır.

PCR işlemleri, “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)” tarafından önerilen real-time RT-PCR (rRT-PCR) protokolüne göre yapılmıştır<sup>(5)</sup>. İnfluenza A, B’nin primer-probe dizileri, internal kontrol (RNaseP) ve kontroller Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nden sağlanmıştır. Amplifikasyon işlemi için Real Time ready RNA Virus Master (Light Cycler 480 RNA Master (Roche, Ref No: 05619416001, Almanya) enzim miksi kullanılarak LightCycler 480 II (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için 8.6 µl moleküler su, 0.5 µl primer, 1 µl probe, 0.4 µl enzim, 4 µl reaksiyon buffer olarak hazırlanan toplam 15 µl karışım üzerine 5 µl RNA izolatu eklenmiştir. Amplifikasyon koşulları; 50°C’de 8 dakika, 95°C’de 30 sn, (95°C’de 0.1 sn + 55°C’de 20 sn + 72°C’de 0.1 sn) X 45 döngü ve 40°C’de 30 sn soğutma olarak düzenlenmiştir. Sonuçlar LightCycler 480 II cihazındaki amplifikasyon eğrilerinin değerlendirilmesi ile rapor edilmiştir.

SARI olgularına ait örneklerde influenza ile birlikte 21 solunum yolu virüsü FTD Respiratory pathogens 21 (fast-tract DIAGNOSTICS, Lüksemburg) kiti kullanılarak RotorGene 3000 (QIAGEN, Almanya) cihazında mütipleks real-time PCR yöntemi ile araştırılmıştır.



## BULGULAR

2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda 20. hafta itibarı ile 478 sentinel ILI olgusuna ait burun sürüntü örneği incelenmiştir. Bu örneklerin 138 (%29)'ünde influenza virüsü saptanmıştır. Pozitif örneklerin 44 (%32)'ü influenza A (H1N1) pdm09, 60 (%43)'ü influenza A H3N2, 34 (%25)'ü influenza B olarak belirlenmiştir. İnfluenza Referans Laboratuvarı sentinel ILI sürveyans bulguları Grafik 1'de verilmiştir.

2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda 20. hafta itibarı ile 462 sentinel SARI olgusuna ait burun sürüntü örneği incelenmiştir. Bu örneklerin 79 (%17)'ünde influenza virüsü saptanmıştır. İzole edilen influenza suşlarının alt tiplere göre dağılım, influenza A (H1N1) pdm09 43 (%54.4), influenza A H3N2 23 (%29.1), influenza B 13 (%16.5) olarak belirlenmiştir. 2015-2016 Grip Sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı sentinel SARI sürveyans bulguları Grafik 2'de verilmiştir. Sentinel SARI olgularına ait örneklerin 155 (%34)'ünde influenza dışı solunum yolu virüsleri saptanmıştır.

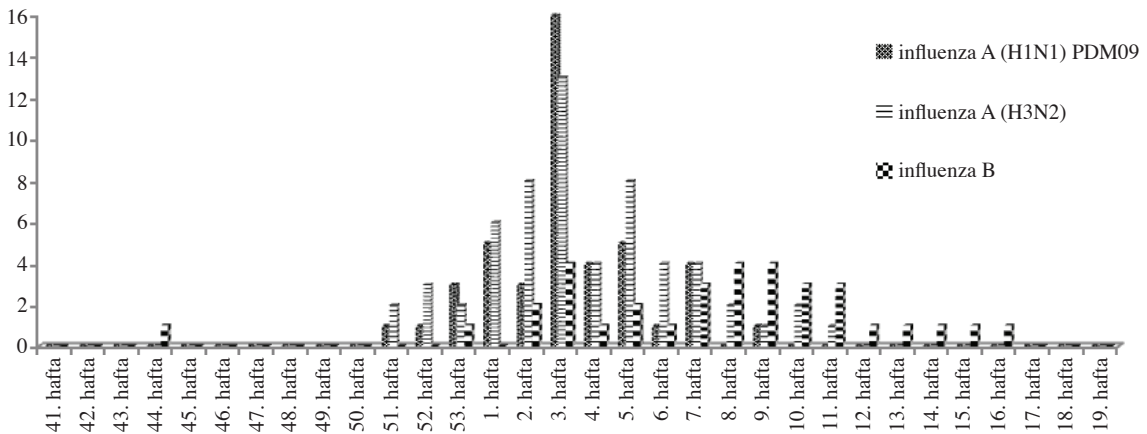
2015-2016 Grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda 20. hafta itibarı ile 1084 non-

sentinel SARI olgusuna ait burun sürüntü örneği incelenmiştir. Bu örneklerin 393 (%36)'ünde influenza virüsü saptanmıştır. İnfluenza saptanan örneklerin 232 (%59)'si influenza A (H1N1) pdm09, 118 (%30)'i influenza A H3N2, 43 (%11)'ü influenza B olarak belirlenmiştir. 2015-2016 Grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı nonsentinel SARI sürveyans bulguları Grafik 3'te verilmiştir.

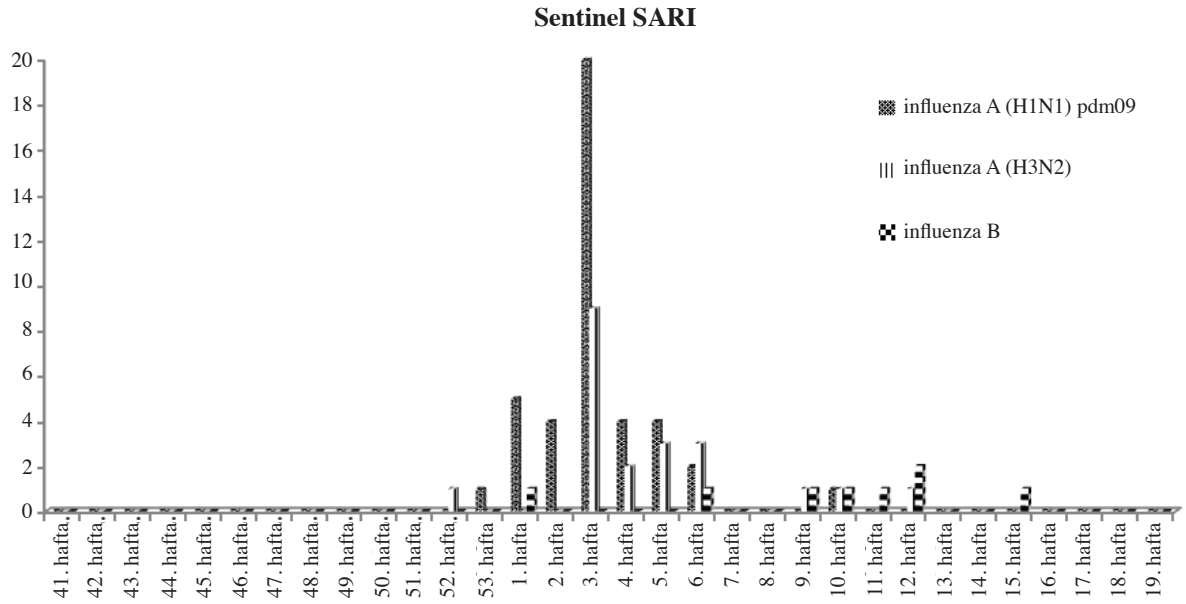
2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda 20. hafta itibarı ile toplam 2024 burun sürüntü örneği incelenmiştir. İncelenen örneklerin 610 (%30)'unda influenza saptanmıştır. İzole edilen influenza suşlarında alt tip dağılımı, influenza A (H1N1) pdm09 319 (%52), influenza A H3N2 201 (%33) ve influenza B 90 (%15) olarak belirlenmiştir. Sentinel ILI, sentinel SARI ve nonsentinel örneklerinde saptanan influenza tipleri Grafik 4'te karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'na yatışı yapılan hastalardan gönderilen örneklerde influenza pozitifliğinin 0-4, 5-14, 15-64, 65 ve üzeri yaş gruplarındaki dağılımı incelenmiştir. Buna göre en fazla influenza pozitifliği 15-64 yaş grubunda saptanmıştır. Tüm yaş gruplarında en fazla influenza A (H1N1)

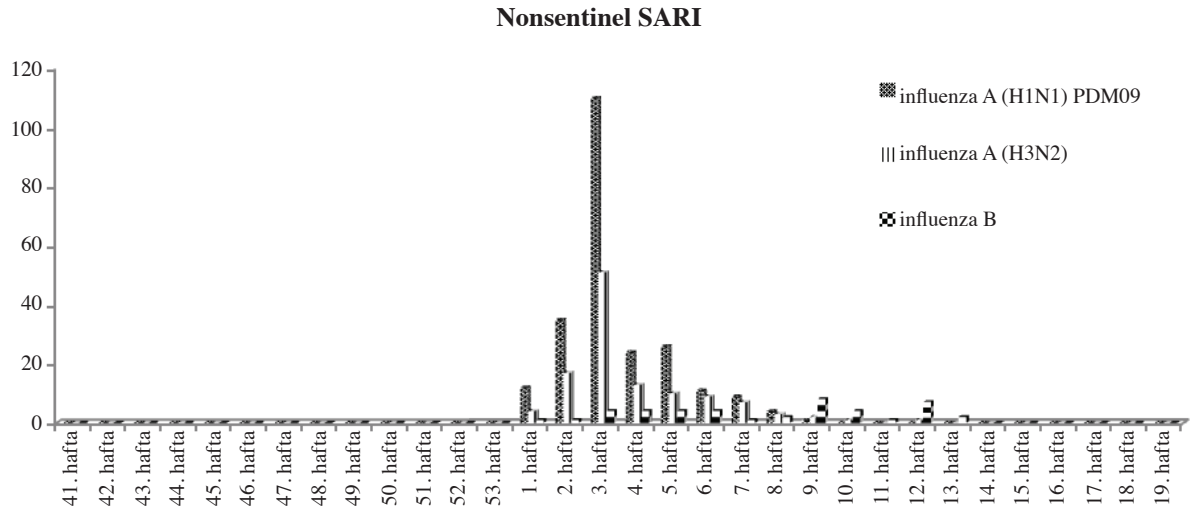
### Sentinel ILI



Grafik 1. 2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı sentinel ILI sürveyans bulguları.



Grafik 2. 2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı sentinel SARI sürveysi bulguları.

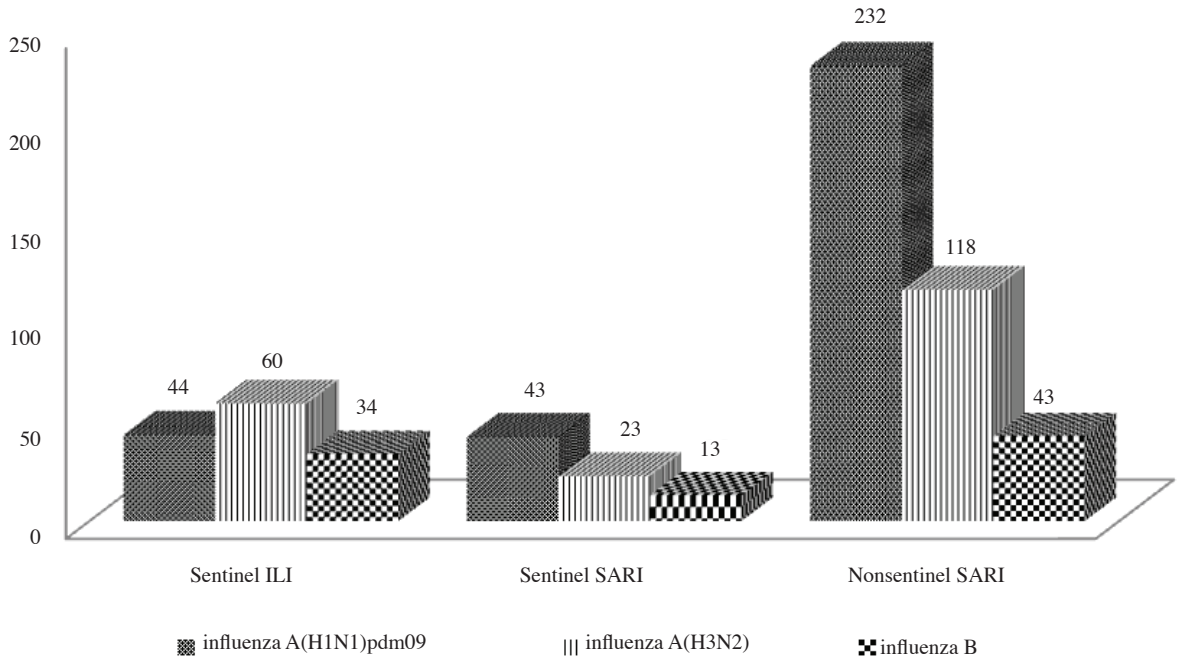


Grafik 3. 2015-2016 grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı nonsentinel SARI sürveysi bulguları.

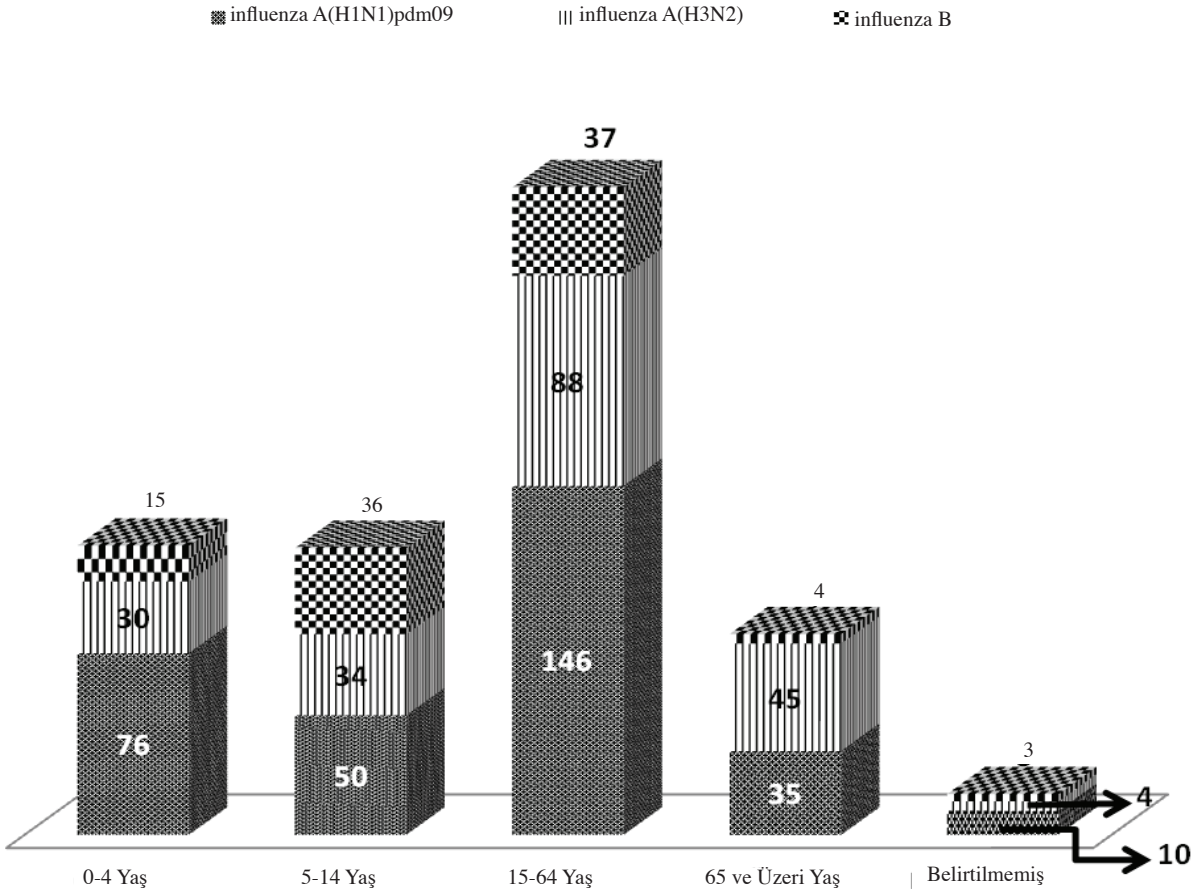
pdm01 görülürken, 65 ve üzeri yaş grubunda influenza A(H3N2) daha fazla sayıda saptanmıştır (Grafik 5).

2015-2016 Grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda izole edilen influenza suşlarının antijenik ve genetik özellikleri DSÖ ile iş birliği içerisinde Londra merkezli "Francis Crick" Enstitüsü'nde belirlenmiştir. Enstitünün raporuna göre influenza A (H1N1) pdm09 suşla-

rının antijenik özelliği "A/California/7/2009/like" ile uyumlu bulunmuştur. Bu suşlar HA ve NA gen analizlerine göre 6B1 grubunda sınıflandırılmıştır. İnfluenza A (H3N2) suşlarının antijenik özelliği "A/Switzerland/9715293/2013-like" ve "A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like virus" ile uyumlu saptanmıştır. HA ve NA gen analizlerine göre ise 3C3a ve 3C2a gruplarında sınıflandırılmıştır. 2015-2016 Grip sezonunda İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda izole edilen



Grafik 4. 2015-2016 Grip sezonunda sentinel ILI, sentinel SARI, nonsentinel SARI sürveyansında haftalık influenza tipleri.



Grafik 5. 2015-2016 grip sezonunda yatışı yapılan hastalarda influenza tiplerinin yaş gruplarına göre dağılımı.

influenza B suşlarının Victoria B soyundan olduğu belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

İnfluenza virüsleri ani olarak başlayan 37.8'in üzerinde ateş, hâlsizlik, kas ağrısı, öksürük, boğaz ağrısı gibi belirtilerle karakterize grip hastalığına neden olur <sup>(6)</sup>. Her yıl dünyada 3-5 milyon kişide ağır seyreden ve 250-500 bin kişide ölüme sonuçlanan influenza kaynaklı hastalık tabloları ile karşılaşılır <sup>(7)</sup>. Grip ile mücadelede aşımın yanı sıra sürveyans çalışmaları ile toplumda grip aktivitesinin başlangıç ve bitiş tarihleri, pik yaptığı dönemi ve salgından sorumlu olan tiplerin belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla DSÖ Global İnfluenza Surveillance and Response System (GISRS) ile dünyadaki grip aktivitesini izlemektedir. GISRS bünyesinde bulunan 6 kollaboratif merkez, 11 H5 referans merkezi ve 110 ülkede bulunan 140 ulusal influenza referans merkezi ile sürveyans çalışmaları yürütülmektedir. Sürveyans çalışmalarından elde edilen veriler FluNet veri tabanı aracılığı ile eşzamanlı olarak grafik, tablo, harita gibi çeşitli görseller eşliğinde paylaşımına sunulmaktadır. Flunet bağlantılı olarak Avrupa, Pan Amerika, Güney Asya ve Batı Pasifik bölgelerinin kurumsal verilerine ulaşmak olasıdır <sup>(8)</sup>.

Avrupa Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centers for Disease Control and Prevention; ECDC) 2015-2016 influenza aktivitesinin düşük yoğunlukta geçtiğini açıklamıştır. Avrupa'da 50. haftada başlayan 2015-2016 influenza aktivitesinin, 20. haftaya kadar devam

ettiği ve pik döneminin 5-7 haftalar arasında olduğu bildirilmiştir <sup>(9)</sup>. Laboratuvarımızın 2015-2016 influenza aktivitesinin izleminde ilk pozitiflik 51. haftada saptanmıştır. Verilerimize göre 17. haftaya kadar devam eden influenza aktivitesinin pik dönemi 3. haftada izlenmiştir. Laboratuvarımızın sonuçları, izlemine yaptığımız bölgelerde influenza aktivitesinin Avrupa'ya göre daha erken (3. haftada) pik yaparak 17. haftada sona erdiğini göstermiştir (Tablo 1).

ECDC'nin 2016 Mayıs raporuna göre Avrupa genelinde sentinel sürveyans kapsamında incelemeye alınan 50861 örneğin 18640 (%36.7)'inde pozitiflik saptanmıştır. Bu raporda, pozitif örneklerin 10496'sında (%56.3) influenza A suşu, 8144'ünde (%43.7) influenza B suşu izole edildiği belirtilmiştir. İzole edilen influenza A suşlarının 10.030'unda tiplendirilme yapıldığı ve 8665'i (%86.4) influenza A (H1N1) pdm09, 1365'i (%13.6) influenza A (H3N2) olarak tiplendirildiği açıklanmıştır. ECDC raporunda, influenza B suşlarından 4119'unun soy tayini yapıldığı ve bunların 3974'ünün (%96.5) Victoria, 145'inin (%3,5) ise Yamagata soyundan oldukları bildirilmiştir <sup>(9)</sup>. Laboratuvarımızda 2015-2016 grip sezonunda 478 ILI, 462 SARI olgusuna ait olmak üzere toplam 940 örnek sentinel sürveyans kapsamında incelenmiştir. ILI olgularında 138, SARI olgularında 79 olmak üzere tüm sentinel örneklerde 217 (%23.1) influenza pozitifliği saptanmıştır. Sentinel ILI ve SARI olgularına ait örneklerde sırası ile 104 ve 66 olan influenza A pozitifliği toplam 170 (%78.3) örnekte saptanmıştır. Sentinel örneklerde influenza A pozitifliğinin alt tiplere göre dağılımı 87

Tablo 1. 2015-2016 sezonunda influenza aktivitesi.

2015-2016	İnfluenza Referans Laboratuvarı	Avrupa	ABD
Sezon başlangıç ve bitiş	51.-17. hafta	50.-20. hafta	40.-20. hafta
Pik yaptığı dönem	3. hafta	5.-7. hafta	10. hafta
Pik yüzdesi	%79	% 46	%23.7
Baskın İnfluenza tipi	A (H1N1) pdm09	A (H1N1) pdm09	A (H1N1) pdm09
Baskın B soyu	B Victoria	B Victoria	B/Yamagata

**Tablo 2. 2015-2016 influenza sürveyans sonuçları.**

2015-2016 Sentinel Sürveyans	İnfluenza Referans Laboratuvarı, İstanbul	Avrupa	ABD
İncelenen örnek sayısı	940	50.861	68.886
İnfluenza pozitifliği	217 (%23.1)	18.640 (%36.7)	26.538 (%38)
İnfluenza A	170 (%78.3)	10.496 (%56.3)	18.78 (%70.8)
Tiplendirme yapılan	170	10.030	18.437
İnfluenza A (H1N1) pdm09	87 (%51.2)	8.665'i (%86.4)	14.877 (%80.7)
İnfluenza A (H3N2)	83 (%48.8)	1.365'i (%13.6)	3.560 (%19.3)
İnfluenza B	47 (%21.7)	8.144 (%43.7)	7.757 (%29.2)
Soyu belirlenen	27	4.119	4.912
B/Victoria	27 (%100)	3.974 (%96.5)	1.545 (%31.5)
B/Yamagata	0	145 (%3.5)	3.367 (%68.5)

**Tablo 3. 2015-2016 sezonunda dolaşımdaki suşların aşı içeriği ile uyumu.**

	İnfluenza A (H1N1) pdm	İnfluenza A (H3N2)	İnfluenza B
Aşı içeriği	A/California/7/2009	A/Switzerland/9715293/2013	B/Pucket/3073/2013/Yamagata B/Brisbane/60/2008/Victoria (Dörtlü aşıda)
ABD	A/California/7/2009	A/Switzerland/9715293/2013	B/Phuket/3073/2013/Yamagata-like (%68.5) B/Brisbane/60/2008/Victoria-like (%31.5)*
Avrupa	A/California/7/2009	A/Hong Kong/4801/2014 A/Switzerland/9715293/2013 (zayıf reaksiyon)	B/Brisbane/60/2008/Victoria-like (%96.5)* B/Phuket/3073/2013/Yamagata-like (%3.5)
İnfluenza Referans Laboratuvarı	A/California/7/2009 A/Christchurch/16/2010	A/Switzerland/9715293/2013 A/Hong Kong/4801/2014	B/Victoria (%100)*

\*Üçlü aşı içeriği ile uyumsuz.

(%51.2) örnekte influenza A (H1N1) pdm09, 83 (%48.8) örnekte influenza A (H3N2) olarak belirlenmiştir. Sentinel sürveyans kapsamında 47 (%21.7) örnekte influenza B pozitifliği saptanmıştır ve soy belirleme çalışması yapılan 27 influenza B örneğin tamamının Victoria soyundan olduğu belirlenmiştir. Laboratuvarımızda sentinel örneklerde saptanan influenza alt tipleri Tablo 2’de Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’ndeki dağılım ile birlikte verilmiştir.

2015-2016 sezonunda ABD’de grip aktivitesi, geçtiğimiz son üç sezona kıyasla daha geç başlamış ve daha hafif seyretmiştir. ABD genelinde görev yapan yaklaşık 350 laboratuvarın sonuçları CDC merkezinde değerlendirilmiş ve toplam 68886 örneğin bulguları sezon bitiminde yayınlanmıştır. Bu sonuçlara göre, ABD’de %38

(26538/68886 örnek) oranında influenza pozitifliği saptanmıştır. Pozitif saptanan örneklerde 18781’i (%70.8) influenza A olarak belirlenirken, 7757 (%29.2) örnekte influenza B izolasyonu bildirilmiştir. İzole edilen influenza A suşlarının 14877’si (%80.7) influenza A (H1N1) pdm09, 3560’ı ise (%19.3) influenza A H3N2 olarak tiplendirildiği raporlanmıştır. Aynı raporda soy tayini yapılan influenza B virüslerinin %68.5’i B/Yamagata, %31.5’i ise B/Victoria olduğu belirtilmiştir. ABD’de 2015-2016 grip sezonunda influenza A (H1N1) suşlarının aşı içeriği ile uyum gösteren A/California/7/2009, influenza A (H3N2) suşları ise A/Switzerland/9715293/2013 antijenik tiplerden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca üç kişide yeni influenza A antijenik tipleri saptandığı ve bu suşların biri influenza A(H1N1) variant: “H1N1v” ola-

rak, biri influenza A (H3N2) variant: “H3N2v”, üçüncüsü ise influenza A (H1N2) variant: “H1N2v” şeklinde isimlendirildiği açıklanmıştır<sup>(10)</sup>. Laboratuvarımızda yeni antijenik özelliğe sahip influenza virüsleri saptanmazken ABD ve Avrupa’da olduğu gibi influenza A suşları aşı içeriği ile uyumlu bulunmuştur. Ancak laboratuvarımızda izolen edilen influenza B suşlarının tamamı aşı içeriğinden farklı olarak “Victoria” soyundan bulunmuştur. Avrupa’da influenza B açısından aşı uyumsuzluğu %96 “Victoria” tespiti ile gözlenirken, ABD’de “Victoria” oranı %36.5’te kalmıştır<sup>(9,10)</sup>. 2015-2016 influenza sezonunda dolaşımdaki suşların aşı içeriği ile uyumu Tablo 3’te verilmiştir. 2015-2016 sezonunda influenza B/Victoria’nın dolaşımda ağırlıklı olması nedeni ile DSÖ 2016-2017 sezonu için üçlü aşı içeriğine Victoria soyundan influenza B suşlarını önermiştir. DSÖ tarafından 2016-2017 sezonunda üçlü aşı içeriği; A/California/7/2009 (H1N1) pdm2009-like virüs, A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like virus ve B/Brisbane/60/2008-like virus (Victoria soyu) suşları olarak belirlenmiştir. Dörtlü aşı içeriğinde ise üçlü aşı suşlarına ek olarak B/Phuket/3073/2013-like virus (B/Yamagata soyu) bulunmaktadır<sup>(11)</sup>.

Genetik karakterizasyon bakımından son yıllarda dolaşımda olan influenza A (H1N1) pdm09 suşlarının 6B1 ve 6B2 genetik grubundan olduğu açıklanırken, laboratuvarımızda izole edilen influenza A (H1N1) pdm09 suşlarının da 6B1 grubundan olduğu belirlenmiştir<sup>(9)</sup>. DSÖ ile iş birliğinde olan laboratuvarlar, dolaşımdaki influenza A (H3N2) suşlarının 3C3a ve 3C2a genetik alt gruplarında toplandığını bildirmişlerdir. Laboratuvarımızdan izole edilen A/İstanbul/188/2015 suşu, 3C.3a grubunda, A/İstanbul/186/2015 suşu 3C.2a grubunda filogenetik olarak sınıflandırılmıştır.

2015-2016 sezonunda influenza virüsleri antiviral duyarlılık açısından değerlendirildiğinde,

ABD kaynakları 2408 influenza suşunun test edildiğini, bunlardan 188 influenza B suşunun, 658 influenza A (H3N2), suşunun oseltamivir, zanamivir ve peramivire duyarlı olduğunu bildirmiştir. Ancak test edilen 2193 influenza A (H1N1) pdm09 suşunun, 18 (%0.8)’inde oseltamivir ve peramivire dirençli olduğu belirtilmiştir<sup>(10)</sup>. ECDC’nin raporunda ise Avrupa’da 2700 influenza A (H1N1) pdm09 suşu, 172 influenza A (H3N2) suşu ve 523 influenza B suşu antiviral duyarlılık açısından incelendiği belirtilmiştir. Bunlardan 26 influenza A (H1N1) pdm09 suşunun, oseltamivire karşı son derece azalmış inhibisyon ile birlikte NA-H275Y substitüsyonu, bir influenza A (H3N2) suşunun oseltamivire karşı azalmış inhibisyon ile birlikte NA-E119V amino asit substitüsyonu gösterdiği bildirilmiştir. B/Victoria soyundan dört influenza suşunda, oseltamavir ve zanamavire karşı son derece azalmış inhibisyon ile birlikte NA-R374K substitüsyonu saptandığı açıklanmıştır. İncelenen diğer suşlarda ise nöraminidaz inhibitörlerine karşı fenotipik ve genotipik antiviral direnç bulgusu olmadığı belirtilmiştir. Laboratuvarımızın gönderdiği izolatlardan beşini antiviral direnç açısından inceleyen Francis Crick Enstitüsü, iki influenza A (H1N1) pdm09 ve üç influenza A (H3N2) suşlarının oseltamavir ve zanamavire karşı normal inhibisyon gösterdiklerini bildirmiştir.

Sonuç olarak, grip etkeni ve etkileri bakımından sürekli değişkenlik gösteren bir hastalıktır. Bu nedenle sürveyans programı çerçevesinde grip aktivitesini ve influenza virüsünün değişimlerini izlemek, salgın öncesinde toplum için gerekli önlemlerin alınması bakımından önemlidir. Ayrıca dolaşımda olan influenza suşları belirlemek bir sonraki dönemin aşı içeriği için öneriler oluşturulmaktadır. Verilerimize göre 2015-2016 grip sezonu izlediğimiz bölgelerde orta şiddette ve influenza A (H1N1) pdm09 baskınlığında yaşanmıştır. DSÖ iş birliği laboratuvarları aracılığı ile antijenik tipleri belirlenen suşlarımızın 2017 aşı içeriği kapsamına alındığı görül-

müştür. Ancak ülkemizde moleküler sürveyans çalışmalarının geliştirilmesi, dolaşımda olan influenza tiplerinin alt gruplarını belirlemek ve antiviral direnç izlemi bakımından önemli olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. **Baron S.** Medical Microbiology. In: Couch RB, eds. Orthomyxoviruses. 4<sup>th</sup> ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Chapter 58.
2. **Us AD.** Pandemik influenza infeksiyonunda etyopatogenez ve laboratuvar tanı yöntemleri. *Hacettepe Tıp Derg* 2010; 41:13-27.
3. **Nkuchia M, M'ikanatha, John Iskander.** Concepts and Methods in Infectious Disease Surveillance. 1<sup>st</sup> ed. UK: John Wiley & Sons, 2015:191-8.
4. **Stephenson I, Zambon M.** The epidemiology of influenza. *Occup Med (Lond)* 2002; 52:241-7. <https://doi.org/10.1093/occmed/52.5.241>
5. **World Health Organization.** CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). 28 Nisan 2001. [[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR\\_SwineH1Assay-2009\\_20090430.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf)]. (Erişim tarihi: 14.10.2016)
6. **Eccles R.** Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:718-25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70270-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70270-X)
7. **Badur S.** Grip Sürveyansı ne Demektir? Önemi ve ülkemize ait bulgular. In: Badur S, Aydın G (eds). 30 Soruda Grip. 1. Basım. Selen Yayıncılık, İstanbul, 2015:61-70.
8. **World Health Organization.** Influenza Flunet. [[http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/flunet/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/)] (Erişim tarihi: 14.10.2016)
9. **European Centers for Disease Control and Prevention.** Influenza virus characterisation, Summary Europe, May 2016. [[http://ecdc.europa.eu/en/publications/\\_layouts/forms/Publication\\_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1506](http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1506)] (Erişim tarihi: 14.10.2016)
10. **Davlin SL, Blanton L, Kniss K, et al.** Influenza Activity-United States, 2015-16 Season and Composition of the 2016-17 Influenza Vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65:567-75. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6522a3>
11. **World Health Organization.** Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season. [[http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016\\_17\\_north/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016_17_north/en/)] (Erişim tarihi: Aralık 2016)

# Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması<sup>§</sup>

Demet GÜR VURAL\*, Belma DURUPINAR\*\*

\*Gebze Fatih Devlet Hastanesi, Kocaeli

\*\*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

## ÖZ

**Amaç:** *Acinetobacter baumannii* aerobik, gram negatif, glikozu fermente etmeyen çoğunlukla yoğun bakım ünitelerinde meydana gelen enfeksiyon salgınlarında sıklıkla yer alan fırsatçı bir patojendir. Son yıllarda *A. baumannii*'ye artan ilginin başlıca nedenlerinden biri salgınlar ve çoğul ilaca dirençli suşların (MDR) ortaya çıkmasına yol açan direnç belirleyicilerini kazanma ve biriktirme yeteneğine olan eğilimidir. Bu organizmanın hastane çevresinde uzun süre yaşayabileceği özelliği, genetik fleksibilitesi ve yüksek uyum yeteneği, karbapenemleri de içeren bir çok antimikrobiyal sınıfa dirençli MDR *A. baumannii* suşlarının özellikle son bir kaç yılda hızlı ve global yayılımının nedeni olmuştur. Karbapenemler *A. baumannii* tedavisinde kullanılan beta laktam grubu önemli ajanlardır. *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci dünya çapında giderek artan oranlarda rapor edilmekte ve gelişmekte olan antimikrobiyal direncin habercisi olmaktadır. Günümüzde karbapenem dirençli *A. baumannii*, antibiyotik tedavisi için seçeneklerin sınırlı olması nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. *Acinetobacter* türlerinin karbapenem direnç mekanizmaları arasında en yaygın olanı OXA-tipi enzimlerdir. *A. baumannii*, OXA-23 ve türevleri, OXA-24 ve türevleri, OXA-51 ve türevleri ve OXA-58 olarak özetlenebilecek 4 farklı karbapenemleri hidrolize edebilen enzim ailesini içerebilmektedir. Bu çalışmada, hastanemizden çeşitli servislerinde izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA tipi Sınıf D Beta Laktamazların araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma kapsamına çeşitli klinik örneklerden soyulanan 100 karbapenem dirençli *A. baumannii* klinik izolatu dâhil edildi. VITEK2 sistemi (bioMérieux, ABD) ile izolatlar tür düzeyinde tanımlandı ve antimikrobiyal duyarlılık testleri yapıldı. İmipenem ve meropenem Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) değerleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptandı. İzolatlarda OXA karbapenemazlardan olan bla<sub>OXA-23</sub>, bla<sub>OXA-24</sub>, bla<sub>OXA-51</sub>, bla<sub>OXA-58</sub> gen bölgelerinin varlığı PZR ile araştırıldı.

**Bulgular:** Antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre tüm izolatlar piperasilin, sefepim ve seftazidime dirençli bulunmuştur. Çalışmadaki *A. baumannii* klinik izolatlarının tamamı kolistine duyarlı görülmektedir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile bütün izolatlar imipenem ve meropeneme dirençli bulunmuştur. İzolatların tamamında *A. baumannii*'ye özgü olan bla<sub>OXA-51</sub> pozitif bulundu. İzolatların %93'ünde bla<sub>OXA-23</sub> pozitif bulundu. İzolatlarda bla<sub>OXA-24</sub> ve bla<sub>OXA-58</sub> gen bölgelerine saptanmadı.

**Sonuç:** OXA tipi karbapenemazların yaygınlığı ile beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin yüksek seviyede olması dikkat çekicidir. Çalışmamız sonucunda karbapenem direncinin; OXA-51 tip doğal oksasilinazın aşırı üretimi sonucu ve OXA-23 enzim geninden kaynaklanabileceği; bunun yanında diğer direnç mekanizmalarının ileri çalışmalarda incelenmesini gerektirdiği düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, karbapenem, oksasilinazlar

## ABSTRACT

**Investigation of the Presence of Class D Beta-lactamases in Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii***

**Objective:** *Acinetobacter baumannii* is an aerobic, gram negative and glucose non-fermenting opportunistic pathogen that is frequently associated with outbreaks mostly in intensive care units. One of the main reasons for the growing interest in *A. baumannii* in recent years is its tendency to produce outbreaks and its ability to acquire and to accumulate resistance determinants that lead to the emergence of multidrug resistant (MDR) strains. The survival of this organism in hospital environment for long periods, its genetic flexibility and high adaptability has resulted in rapid and global spread of MDR *A. baumannii* strains resistant to many antimicrobial classes, including carbapenems, especially in the last few years. Carbapenems are important agents of the beta-lactam group that are used in the treatment of *Acinetobacter baumannii* infections. Carbapenem resistance in *Acinetobacter* species has been increasingly reported throughout the world and has become the indicator of emerging antimicrobial resistance. Carbapenem resistant *A. baumannii* is considered as an important health problem today because of limited number of treatment options. The most common mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter* species involves OXA-type enzymes. *A. baumannii* can produce four different families of enzymes including OXA-23, OXA-24, OXA-51 and OXA-58 and derivatives of all these 4 enzymes that can hydrolyze carbapenems. In this study, we aimed to investigate OXA-type Class D beta-lactamases on carbapenem-resistant *A. baumannii* strains isolated from various clinics of our hospital.

**Material and Methods:** One hundred clinical isolates of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolated from various clinical specimens were included in the study. Isolates were identified and their antibiotic susceptibility tests were performed by VITEK 2 system (bioMérieux, USA). Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values for imipenem and meropenem were determined by broth microdilution method according to the recommendations of CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). The presence of OXA carbapenemases namely bla<sub>OXA-23</sub>, bla<sub>OXA-24</sub>, bla<sub>OXA-51</sub>, bla<sub>OXA-58</sub> gene regions in isolates was investigated by PCR.

**Results:** All isolates were found to be resistant to piperacillin, cefepime and ceftazidime according to the antimicrobial susceptibility test results. All *A. baumannii* clinical isolates in the study appeared to be susceptible to colistin. All isolates were found to be resistant to imipenem and meropenem with broth microdilution method. *A. baumannii* specific bla<sub>OXA-51</sub> was found to be positive in all isolates. While bla<sub>OXA-23</sub> was found to be positive in 93% of the isolates, bla<sub>OXA-24</sub> and bla<sub>OXA-58</sub> gene regions weren't detected in isolates.

**Conclusion:** The high level of resistance to beta lactam antibiotics and the high prevalence of OXA type carbapenemases are remarkable. As a result of the study, it was concluded that carbapenem resistance may occur as a result of the overproduction of OXA-51 type natural oxacillinases and the presence of OXA-23 gene. Additionally, further studies are needed to investigate other resistance mechanisms.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, carbapenem, oxacillinases

**Alındığı tarih:** 04.10.2016

**Kabul tarihi:** 02.01.2017

**Yazışma adresi:** Demet Gür Vural, Gebze Fatih Devlet Hastanesi, Kocaeli

**e-posta:** demet-gur@yandex.com

<sup>§</sup> Bu çalışma II. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde (9-13 Kasım 2013, Antalya) poster bildiri olarak sunulmuştur.



## GİRİŞ

*Acinetobacter baumannii* hastane kaynaklı ve bazen toplumdan kazanılmış enfeksiyonların etkeni olarak son on yılda önem kazanmış Gram negatif bir kokobasildir<sup>(1)</sup>. 1960'lı yıllarda patojenitesinin oldukça düşük olması nedeniyle klinik örneklerden izole edildiğinde göz ardı edilmiş olsa da günümüzde *A. baumannii* özellikle yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde en önemli patojenlerden biri olmuştur<sup>(1)</sup>.

Nozokomiyal *A. baumannii* enfeksiyonları, kritik hastalarda ventilatör ilişkili pnömoni, bakteriyemi, yara enfeksiyonları ve nozokomiyal menenjit; toplumdan kazanılmış enfeksiyonları ise, olağan dışı durumlarda başlıca pnömoni ve yara enfeksiyonlarından oluşur<sup>(1)</sup>. *A. baumannii* enfeksiyonları için predispozan faktörler; antibiyotik tedavisi, major cerrahi, yanıklar, immünsupresyon, invaziv araç varlığı ve özellikle mekanik ventilasyondur<sup>(1)</sup>.

Son yıllarda *A. baumannii*'ye artan ilginin başlıca nedenlerinden biri salgınlar ve çoğul ilaca dirençli suşların (MDR) ortaya çıkmasına yol açan direnç belirleyicilerini kazanma ve biriktirme yeteneğine olan eğilimidir<sup>(1)</sup>. Bu organizmanın hastane çevresinde uzun süre yaşayabilme özelliği, genetik fleksibilitesi ve yüksek uyum yeteneği, karbapenemleri de içeren birçok antimikrobial sınıfına dirençli MDR *A. baumannii* suşlarının özellikle son birkaç yılda hızlı ve global yayılımının nedeni olmuştur<sup>(1)</sup>. YBÜ'nde *A. baumannii* klinik izolatlarının %30'dan fazlası sıklıkla fluorokinolonlar ve karbapenemleri içeren en az üç antibiyotik sınıfına dirençlidir<sup>(1)</sup>.

*Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci dünya çapında giderek artan oranlarda rapor edilmekte ve gelişmekte olan antimikrobiyal direncinin habercisi olmaktadır<sup>(2)</sup>. Surveyans çalışmaları karbapenem dirençli izolatların oranının son on yılda Avrupa, Kuzey Amerika ve Latin Amerika'da kademeli olarak arttığını göstermektedir<sup>(3)</sup>. Karbapenem dirençli *A. baumannii* salgınları Türkiye'nin de içinde bulunduğu birçok Avrupa, Ortadoğu, Kuzey Amerika ve Latin Amerika, Uzakdoğu ve Kuzey

Afrika ülkelerinde farklı coğrafik bölgelerden dökümanete edilmiştir<sup>(3)</sup>. Günümüzde artık karbapenem dirençli *A. baumannii*, antibiyotik tedavisi için seçeneklerin sınırlı olması nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir.

Karbapenemler çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında tercih edilen antibiyotiklerdir. Kazanılmış karbapenem direnci sıklıkla IMP-, VIM- ve SIM-tipi metallo-beta-laktamazlar ya da OXA-tipi karbapenamazlar ile ilişkilidir. OXA-23, OXA-24, OXA-58 tip sınıf D karbapenamazlar ve doğal oksasilinaz (OXA-51)'in aşırı üretimi *A. baumannii*'de kazanılmış karbapenem direncinden sorumludur<sup>(2)</sup>. Bu çalışmada, hastanemiz servislerinden izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA tipi Sınıf D beta laktamazların araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel izolatlar ve antimikrobiyal duyarlılık testleri: Ocak 2011-Haziran 2011 tarihleri arasında Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen yinelemesi olmayan karbapenem dirençli 100 *A. baumannii* izolatı çalışmaya dâhil edildi. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistem kullanılarak belirlendi. Karbapenem duyarlılıkları disk difüzyon testleri ile de doğrulandı. Duyarlılık testleri sonuçları CLSI M100-S21 standartlarına göre duyarlı (S), ara duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak kategorize edildi<sup>(4)</sup>. CLSI M100-S21'in önerileri doğrultusunda imipenem ve meropenem MİK değerleri belirlendi<sup>(4)</sup>. Testte katyon ayarlı Mueller-Hinton-Buyyon (KAMHB) ve U tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Kontrol suş olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı. Çalışmada kullanılan imipenem (Merck&Co Inc, ABD) ve meropenem (AstraZenica, ABD) üretici firmadan temin edildi. Antibiyotik konsantrasyonları imipenem ve meropenem için son konsantrasyon 256 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Bakteriler çalışma zamanına kadar -80°C'de %10'luk gliserinli buyyon besiyeri içerisinde saklandı. Sonuçlar CLSI M100-S22 klavuzuna göre değerlendirildi<sup>(4)</sup>.

**DNA ekstraksiyonu:** Klinik ve pozitif kontrol suşlarında DNA ekstraksiyonu "Invitrogen PureLink Genomic DNA Kit"i kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

**PZR amplifikasyonu:** PZR'de *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> gen bölgelerinin çoğaltılması için gerekli primer çiftleri Tablo 1'de sunulmuştur.

PZR'de *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> gen bölgelerinin saptanması Woodford ve ark.'nın<sup>(5)</sup> çalışması esas alınarak konvulsiyonel PZR ile çalışıldı. Her reaksiyona pozitif kontrol olarak *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> gen bölgelerini içeren *A. baumannii* suşu eklendi. *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> gen bölgelerinin amplifikasyonu için Tablo 2'de belirtilen döngü kullanıldı<sup>(5)</sup>. Pozitif kontrol suşları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Ayrıca her reaksiyona kalıp DNA yerine steril distile suyun kullanıldığı, bir negatif kontrol de eklendi.

PZR ürünü DNA'ların (amplikonların) tespiti için DNA jel elektroforezi kullanıldı. Jel UV ışığı altında Gel Doc XR (Bio-Rad, ABD) cihazı ile görüntülendi ve Quantity One (Bio-Rad, ABD) yazılımı kullanılarak görüntüler kaydedildi. Beklenen yerde DNA bandı saptanan örnekler PZR pozitif olarak kaydedildi. Bu araştırma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından PYO.TIP.1904.11.013 proje numarası ile desteklenmiştir

## BULGULAR

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100

**Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri<sup>(5)</sup>.**

Primer adı	Primer dizisi (5'→3')	Baz çifti (bp)
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	5-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3 5-ATTCTGACCGCATTCCAT-3	501bp
<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	5-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3 5-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3	246bp
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	5-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3 5-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3	353bp
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	5-AAGTATTGGGGCTGTCTG-3 5-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3	599bp

**Tablo 2. *bla*<sub>OXA</sub> allellerinin PZR yöntemindeki sıcaklık döngüleri.**

94°C'de 5 dakika (ön denatürasyon)	1 Döngü
94°C'de 25 saniye (hedef DNA denatürasyonu)	} 30 Döngü
52°C'de 40 saniye primer bağlanması	
72°C'de 50 saniye primer uzaması	
72°C'de 6 dakika son uzama	1 Döngü

*A. baumannii* izolatu kullanıldı. Bu izolatların 38 (%38)'i trakeal aspirat örneklerinden, 17 (%17)'si balgam, 14 (%14)'ü kan, 14 (%14)'ü idrar, 4 (%4)'ü yara, 3 (%3)'ü eksuda, 3 (%3)'ü akıntı ve 7 (%7)'si de çeşitli klinik örneklerden (apse, ameliyat materyali, beyin-omurilik sıvısı gibi) izole edildi.

İzole edilen suşların çoğunluğu yoğun bakım ünitesinden gelen örneklerdendi. Suşların kliniklere göre dağılımı Tablo 3'te sunulmuştur.

Çalışmaya alınan karbapenem dirençli *A. baumannii* klinik izolatlarının VITEK2 sistemi (BioMérieux, ABD) ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 4'te verilmiştir. Tüm izolatlar piperasilin, sefepim ve seftazidime dirençli bulunmuştur. Çalışmadaki *A. baumannii* klinik izolatlarının tamamı kolistine duyarlı bulunmuştur.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen imipenem ve meropenem MİK değerlerine göre suşların dağılımı Tablo 5'te verilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile orta duyarlı bulunan izolatlar dirençli kabul edilmiştir<sup>(6)</sup>. Meropenem MİK değerleri imipenem MİK değerlerine göre yüksek bulunmuştur.

**Tablo 3. Gönderilen materyallerin servislere göre dağılımı.**

Klinik	Sayı	%
Yoğun bakım ünitesi	28	28.0
Göğüs hastalıkları	13	13.0
Dâhiliye	12	12.0
Beyin cerrahi	8	8.0
Genel cerrahi	5	5.0
Üroloji	5	5.0
Hematoloji	4	4.0
Nöroloji	4	4.0
Onkoloji	4	4.0
Enfeksiyon	3	3.0
Çocuk yoğun bakım	3	3.0
Plastik cerrahi	2	2.0
Yenidoğan yoğun bakım	2	2.0
Çocuk sağlığı	1	1.0
Diğer	6	6.0
Toplam	100	100.0

**Tablo 4. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının VITEK2 sistemi ile saptanan antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.**

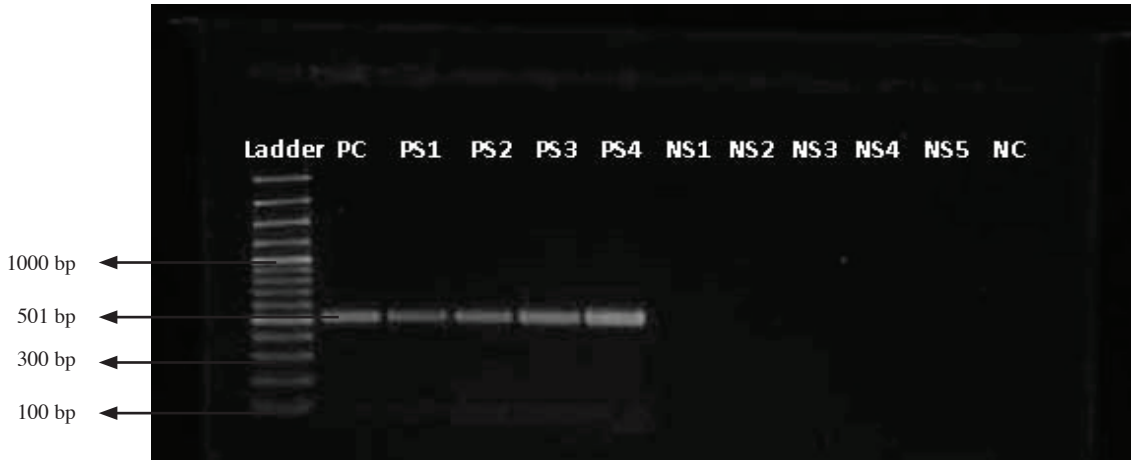
Antibiyotik	Duyarlı %	Orta derecede duyarlı %	Dirençli %
Amikasin	27	11	62
Sefepim	-	-	100
Seftazidim	-	-	100
Siprofloksasin	1	-	99
Kolistin	100	-	-
Gentamisin	38	-	62
Levofloksasin	2	8	90
İmipenem	-	-	100
Meropenem	-	-	100
Piperasilin	-	-	100
Piperasilin-Tazobaktam	1	-	99
Tetrasiklin	16	12	72
Trimetoprim-Sulfametoksazol	27	-	73

**Tablo 5. İmipenem ve meropenem MİK değerlerine göre suşların dağılımı.**

MİK değerleri (µg/ml)	8	16	32	64	128	256
İmipenem MİK değerine göre suşların sayıları	4	44	37	13	1	1
Meropenem MİK değerine göre suşların sayıları	2	14	42	34	7	1

**Tablo 6. OXA tipi karbapenemazların pozitiflik oranları.**

Enzim	Sayı (%)
OXA-51	100 (100)
OXA-23	93 (93)
OXA-24	0
OXA-58	0

**Şekil 1.  $bla_{OXA-23}$  gen bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü.**

Ladder: Promega 100 bp DNA Ladder Plus; PS 1-4: Pozitif Suş; NS 1-5: Negatif Suş; PC:  $bla_{OXA-23}$  pozitif *A. baumannii*; NC: Negatif Kontrol.

Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının PZR'lerinde tüm reaksiyonlarda pozitif kontrol olarak kullanılan  $bla_{OXA-23}$ ,  $bla_{OXA-24}$ ,  $bla_{OXA-51}$ ,  $bla_{OXA-58}$  gen bölgelerine ait bantlarda görüntü saptandı. Her reaksiyon sonrası jelin son kuyucuklarına eklenen negatif kontrollerin hiçbirinde bant gözlenmedi. Yüz karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının PZR'de  $bla_{OXA-23}$ ,  $bla_{OXA-24}$ ,  $bla_{OXA-51}$ ,  $bla_{OXA-58}$  gen bölgelerinin tespit edildiği jel görüntüleri Şekil 1-4'te sunulmuştur.

PZR ile izolatların hepsinde  $bla_{OXA-51}$  gen bölgesi saptandı. İzolatların 93'ünde  $bla_{OXA-23}$  gen bölgesi saptanırken,  $bla_{OXA-24}$  ve  $bla_{OXA-58}$  gen bölgesi hiçbir izolatta saptanmadı. OXA tipi karbapenemazların pozitiflik oranları Tablo 6'da sunulmuştur.

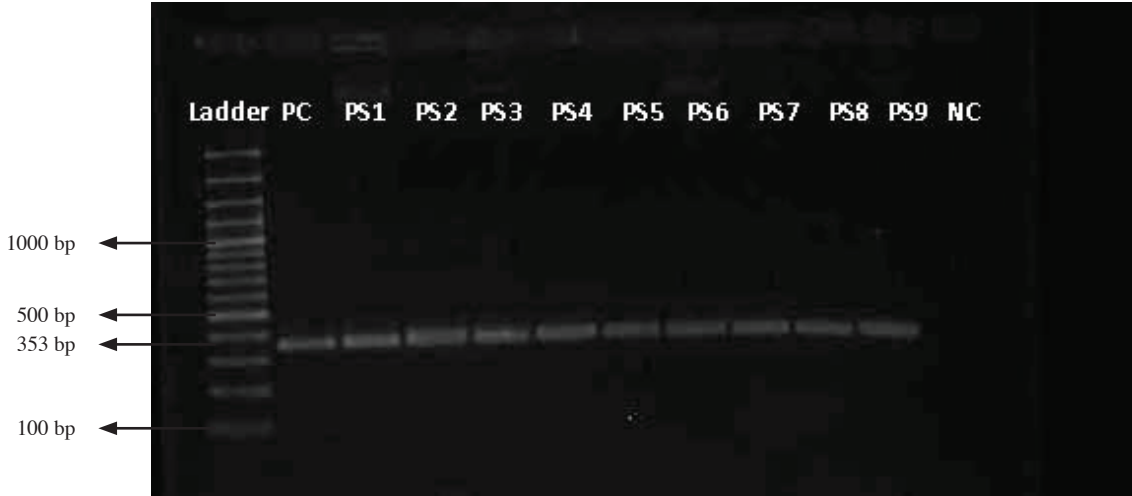
## TARTIŞMA

*Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları, dünya



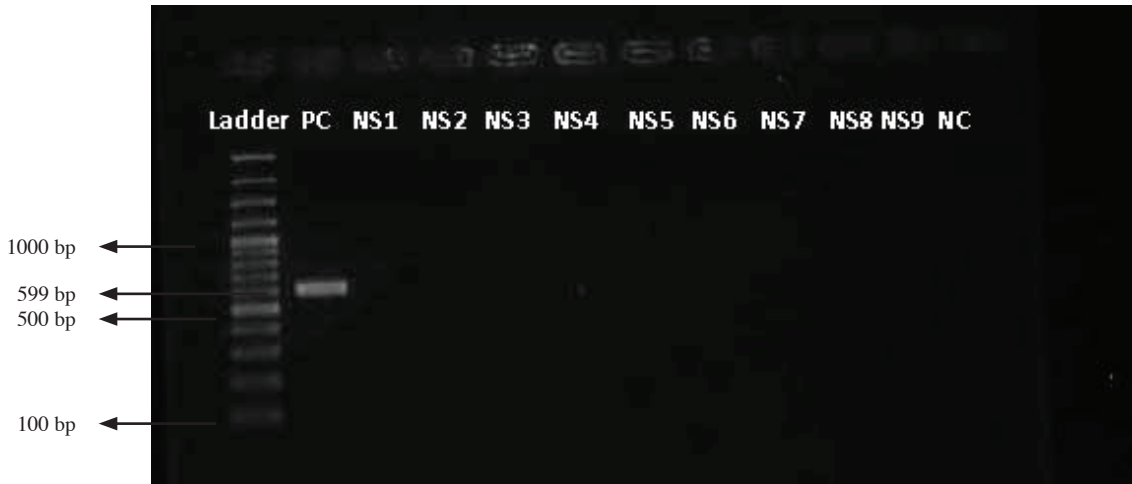
Şekil 2. *bla*<sub>OXA-24</sub> gen bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü.

Ladder: Promega 100 bp DNA Ladder Plus; PS: Pozitif Suş; NS1-9: Negatif Suş; PC: *bla*<sub>OXA-24</sub> pozitif *A. baumannii*; NC: Negatif Kontrol



Şekil 3. *bla*<sub>OXA-51</sub> gen bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Ladder: Promega 100 bp DNA Ladder Plus; PS 1-9: Pozitif Suş; NS: Negatif Suş; PC: *bla*<sub>OXA-51</sub> pozitif *A. baumannii*; NC: Negatif Kontrol



Şekil 4. *bla*<sub>OXA-58</sub> gen bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü.

Ladder: Promega 100 bp DNA Ladder Plus; PS: Pozitif Suş; NS 1-9: Negatif Suş; PC: *bla*<sub>OXA-58</sub> pozitif *A. baumannii*; NC: Negatif Kontrol

genelinde hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biridir. Kuruluğa ve dezenfektanlara gösterdiği direnç nedeniyle hastane yüzeylerinde ve tıbbi cihazlarda uzun süre canlılığını koruyabilmesi, karbapenem direnci dâhil olmak üzere çoklu antibiyotik direncinin giderek artan oranlarda karşımıza çıkması ve özellikle yoğun bakım birimlerinde salgınlara yol açabilmesi, *A. baumannii*'nin sürekli gündemde olan bir patojen olmasına neden olmaktadır.

*Acinetobacter* suşlarının izole edildiği örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalarda farklılıklar göstermektedir. Gözütok ve ark.'nın<sup>(7)</sup> Kayseri'de yaptıkları çalışmada, *A. baumannii* izolatları en sık kan, (%39), ikinci sıklıkta trakeal aspirat (%30), üçüncü sıklıkta idrar (%27) örneklerinde tespit edilmiştir. Keskin ve ark.<sup>(8)</sup> yapmış oldukları çalışmada, *A. baumannii* izolatlarını %35.3 ile en sık trakeal aspirat, %27.3 ile ikinci sıklıkta kan, %18.4 ile üçüncü sıklıkta apse örneklerinden elde etmişlerdir. Çalışmamızda, *A. baumannii*'nin yüksek oranda trakeal aspirattan izole edilmesinin ventilatör ekipmanlarındaki kolonizasyona bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarının servislere göre dağılımı incelendiğinde en fazla yoğun bakım ünitesinden izole edildiği, ikinci sırada göğüs hastalıkları kliniği, üçüncü sırada ise dâhiliye kliniğinin yer aldığı görülmektedir. Çalışma grubumuz bu yönüyle değerlendirildiğinde, diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur<sup>(9,10)</sup>.

Karbapenemler *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen ilaçlardır. Ancak son yıllarda karbapenem dirençli izolatların sayısında artış gözlenmektedir. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada, karbapenem direncinin yıllar içinde arttığı dikkat çekmektedir. Çiftçi ve ark.'nın<sup>(9)</sup> 2008-2011 yıllarını kapsayan çok merkezli olarak yaptıkları çalışmada, karbapenem direnç oranlarında önemli artış gözlenmiş ve karbapenem direncinin %70'in üzerine çıktığı saptanmıştır. Gözütok ve ark.'nın<sup>(7)</sup> 2013 yılında yaptığı çalışmada, imipenem ve meropenem %91 oranında direnç saptarken, Keskin ve ark.<sup>(8)</sup> 2014'te sırası ile %91.5

ve %92 oranında direnç saptamışlardır.

*Acinetobacter baumannii*'de karbapenemlere direnç gelişimine neden olan birçok mekanizma vardır. Karbapenem direncinde etkili olan mekanizmalar kromozomal ya da plazmid aktarımlı karbapenemazlar, dış membran proteinlerinde kayıp, *CarO* geninin yokluğu, penisilin bağlayıcı proteinlerin modifikasyonu, effluks sistemleri olarak sıralanabilir<sup>(3)</sup>. Karbapenem dirençli *A. baumannii*'de dirençten sorumlu en önemli mekanizma karbapenem hidrolize eden beta laktamazlardır<sup>(3)</sup>. *A. baumannii*'de karbapenemaz aktivitesi olan en yaygın beta laktamaz grubu, çoğunlukla bu türler için spesifik olan karbapenem hidroliz eden sınıf D β-laktamazlardır. Bu grupta *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24/40</sub> ve *bla*<sub>OXA-58</sub> ile temsil edilen, kromozomal ya da plazmid aktarımlı üç ana kazanılmış karbapenem hidrolize eden sınıf D oksasilinaz gen kümesi tanımlanmıştır. Ayrıca OXA-51 tip doğal oksasilinazın aşırı üretimi de kazanılmış karbapenem direncine neden olmaktadır<sup>(11)</sup>. *A. baumannii*'de doğal oksasilinazlar olan *bla*<sub>OXA-51</sub> benzeri beta-laktamazları kodlayan genler bugüne kadar çalışılan tüm *A. baumannii* izolatlarında kromozomal yerleşimlidir. Çalışmamızda *A. baumannii*'ye özgü *bla*<sub>OXA-51</sub> geni tüm izolatlarda saptanmıştır, bu da izolatların moleküler doğrulaması niteliğindedir.

OXA türlerinin yayılması yıllara göre farklılıklar göstermiştir. *bla*<sub>OXA-23</sub> genleri son yıllarda diğer OXA genlerinden daha fazla bildirilmiştir. D'Arezzo ve ark.<sup>(12)</sup> İtalya'da 2005-2009 arasında *A. baumannii* izolatları arasında karbapenem direnciyle ilişkili izolatların %71'inde *bla*<sub>OXA-23</sub> ve %22.8'de *bla*<sub>OXA-58</sub> varlığını tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacı 2004-2005'teki çalışmasında, izolatların %80.7'sinde *bla*<sub>OXA-58</sub> gen bölgesi tespit etmiştir<sup>(13)</sup>. Ergin ve ark.<sup>(14)</sup> çalışmalarında, *A. baumannii* izolatları arasında *bla*<sub>OXA-23</sub> (%31) ve *bla*<sub>OXA-58</sub> (%24) oksasilinazların yayılması yıllara göre değişiklik göstermiştir. 2004-2009 yılları arasında *bla*<sub>OXA-58</sub> taşıyan oksasilinazlarda artma gözlenirken, 2008-2010 arasında *bla*<sub>OXA-23</sub> oksasilinazlar yaygın olmuştur<sup>(14)</sup>. Aksoy ve ark.'nın<sup>(10)</sup> çalışmasında, imipenem dirençli suşlarda *bla*<sub>OXA-23</sub> ve *bla*<sub>OXA-51</sub> tüm suşlarda sap-

tanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar tamamlanmamış olmakla birlikte bu prevalans değişikliğinin türe ait klon değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir<sup>(9)</sup>. Verilerimiz dünya çapında *bla*<sub>OXA-23</sub> kökenlerinin ortaya çıkışı ile uyumludur.

Sonuç olarak çalışmamızda, PZR ile oksasilinaz enzimlerinden OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 araştırılmış ve tüm izolatlarda OXA-51 pozitif, OXA-24 ve OXA-58 enzimleri ise negatif olarak bulunmuştur. Bu bulgular doğrultusunda karbapenemaz direncinin; OXA-51 tip doğal oksasilinazın aşırı üretimi ile ilişkili olarak ve OXA-23 enzim geninden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. **Kempf M, Rolain MJ.** Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europa: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:105-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004>
2. **Wang H, Guo P, Sun H, et al.** Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:4022-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.01259-06>
3. **Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3:335-41. <https://doi.org/10.3855/jidc.240>
4. **CLSI.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
5. **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>
6. **Fillaux J, Dubois A, Conil JM, Laguerra J, Marty N.** Retrospective analysis of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolates during a 4-year period in a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:647-53. <https://doi.org/10.1086/507082>
7. **Gözütok F, Sarıgüzel FM, Çelik İ, Berk E, Aydın B, Güzel D.** Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. *ANKEM Derg* 2013; 27:7-12. <https://doi.org/10.5578/mb.7796>
8. **Keskin H, Tekeli A, Dolapçı İ, Öcal D.** Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında beta-laktamaz kaynaklı direncin moleküler karakterizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:365-76. <https://doi.org/10.5578/mb.7796>
9. **Çiftçi İH, Aşık G, Karakeçe E, ve ark.** *Acinetobacter baumannii* izolatlarında blaOXA genlerinin dağılımı: Çok merkezli bir çalışma. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:592-602.
10. **Aksoy MD, Çavuşlu Ş, Tuğrul HM.** Investigation of metallo beta lactamases and oxacillinases in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from inpatients. *Balkan Med J* 2015; 32:79-83. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2015.15302>
11. **Poirel L, Nordmann P.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:826-36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x>
12. **D'Arezzo S, Principe L, Capone A, Petrosillo N, Petrucca A, Visca P.** Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother* 2011; 6:54-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq407>
13. **D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, et al.** Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:347-57. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02668.x>
14. **Ergin A, Hasçelik G, Eser EK.** Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scand J Infect Dis* 2012; 45:26-31. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.708782>

# Bir Üniversite Hastanesinde Kriptokokkoz Olguları<sup>§</sup>

Asuman BİRİNCİ, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, Gumral ALAKBAROVA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

## ÖZ

*Cryptococcus neoformans* kriptokokkoza neden olan kapsüllü bir mayadır. Havada bulunan mantar elemanlarının inhale edilmesiyle vücuda girer. Sıklıkla, immun istem yetmezliği bulunan hastalarda enfeksiyona neden olmaktadır. Başlıca santral sinir sistemi (SSS) ve akciğerleri etkilemekle birlikte, yaygın (dissemine) hastalık tablosu da gelişebilir. Santral sinir sisteminin etkilenmesi sonucunda gelişen menenjit, her zaman klasik bulgularla ortaya çıkmayabilir. Menenjitli olguların beyin omurilik sıvısı (BOS) analizinde lenfositik pleositoz olduğu, protein düzeyinin arttığı, glukoz düzeyinin azaldığı görülür. Tanıda BOS örnekleri çini mürekkebi veya nigrosin boyasıyla boyanarak incelenir. Çini mürekkebi ile boyanmış örneklerde siyah zeminde boyayı almamış tomurcuklanan yapıların görülür. Kesin tanı için kültür gereklidir. Kültür için sikloheksimit içermeyen Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyeri kullanılır. Çalışmamızda 12 yıllık süre zarfında hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilmiş olan altı kriptokokkoz olgusu incelenmiştir. Hastaların bilgileri hasta dosyaları incelenerek elde edilmiştir. İki olgunun, ilk olarak tüberküloz menenjit tedavisi aldığı görülmüştür. Ayrıca, iki hasta HIV pozitifdir. Çalışmamızdaki altı olgudan dördü enfeksiyon nedeniyle kaybedilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Cryptococcus neoformans*, kriptokokkoz, menenjit

## ABSTRACT

### *Cryptococcosis Cases in a University Hospital*

*Cryptococcosis* is caused by *Cryptococcus neoformans*, a capsule-containing yeast. It enters the body predominantly through inhalation of airborne fungal elements from an environmental source. It frequently causes infections specifically in immunosuppressed patients. The yeast mainly invades central nervous system (CNS) and the lungs, although widespread (disseminated) disease may develop. Meningitis that develops as a result of the invasion of the CNS, may not present with the classical symptoms. Analysis of cerebrospinal fluid (CSF) shows lymphocytic pleocytosis, increased protein, and reduced glucose levels in meningitis cases. The samples are stained with Indian ink or nigrosin stain. In Indian ink preparations, white budding organisms are observed as colorless buddings against the dark background. Culture is needed for definitive diagnosis. CSF samples are cultivated on blood agar, Sabouraud dextrose agar (SDA) without cycloheximide and liquid SDA. Culture plates are incubated at 37°C for 24 hours. In our study we investigated six cryptococcosis cases isolated in microbiology laboratory over 12 years. Information of patients were obtained by examining patient files. It was determined that two patients initially received treatment for TB meningitis. Two patients were HIV positive and four of the six patients were lost because of the infection.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, cryptococcosis, meningitis

## GİRİŞ

*Cryptococcus neoformans* kriptokokkoza neden olan kapsüllü bir mayadır. Havada bulunan mantar elemanlarının solunumuyla vücuda alınmasıyla girer. Başta kazanılmış immun yetmezlik sendromu (AIDS) olmak üzere, malignite, organ nakli gibi immun sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla karşılaşılmaktadır. Ancak immün sistemi sağlam insanlarda da hastalığa neden olabilmektedir. Başlıca santral sinir sistemi (SSS) ve akciğerleri

etkilemekle birlikte, yaygın (dissemine) hastalık tablosuyla da karşımıza çıkabilir. Özellikle SSS'nin etkilenmesi sonucunda gelişen menenjit, her zaman klasik bulgularla ortaya çıkmayabilir<sup>(1,2)</sup>. Menenjitli olguların beyin omurilik sıvısı (BOS) analizinde lenfositik pleositoz olduğu, protein düzeyinin arttığı, glukoz düzeyinin azaldığı görülür.

Kriptokok enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısında, olgudan elde edilen klinik örnekler sıvı ise santrifüj edilmeleri gereklidir.

**Alındığı tarih:** 30.09.2016

**Kabul tarihi:** 03.12.2017

**Yazışma adresi:** Asuman Birinci, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

**e-posta:** asumanbirinci@yahoo.com

<sup>§</sup> Bu çalışma III. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde (18-22 Kasım 2015, Antalya) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Santrifüj sonrası, örnekler mikroskopik inceleme için çini mürekkebi veya nigrosin ile boyanabilir. Bu zıt boya ile boya almayan kapsülün görünür hâle gelmesi tanı koydurucudur. Bu yöntem sayesinde HIV negatif kriptokoksik menenjitli hastaların %50'sinden fazlasına, HIV pozitiflerin ise %90'ından fazlasına tanı koyabilmek olasıdır. Kesin tanı için kültür gereklidir. İzolasyon şansını artırmak için de her defasında da 4-8 ml klinik örneğin alınması ve kültür işleminin birkaç kez yinelenmesi önerilmektedir. BOS örnekleri kanlı agara, siklohekzimitisiz Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerine ve Sabouraud'un dekstrozlu buyyon besiyerine ekilir. Kültür plakları, 24 saat 37°C'de inkübe edilir. Mikroorganizma katı besiyerlerinde bej renginde, mukoid koloniler oluşturur<sup>(3)</sup>.

Çalışmamızda, 12 yıllık süre zarfında hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilmiş olan altı kriptokokkoz olgusu incelemeye alınmıştır. Hastaların bilgileri hasta dosyaları incelenerek elde edilmiştir.

## OLGU SUNUMU

Mikrobiyoloji laboratuvarında 2003-2015 yılları arasında altı hastada *C. neoformans* izole edilmiştir. Beşinde menenjit, birinde fungemi tablosu bulunan olguların genel özellikleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

## TARTIŞMA

Kriptokokkoz sporadik bir enfeksiyon olup, insandan insana veya hayvandan insana bulaşma görülmez. Etken solunum yolundan vücuda girer, alveollere ulaşır ve çoğalmaya başlar. Kriptokoklara karşı savunmada hücrel immün yanıtın önemi vardır. Solunum yoluyla alınan kriptokoklara karşı inflamatuvar bir reaksiyon olarak primer bir lenf nodu kompleksi gelişir. Bu kompleks eğer immün yetmezlik yoksa enfeksiyonu sınırlar. Kriptokoklar enfeksiyon sonrasında uzunca bir süre lenf nodları ve akciğerlerde inaktif şekilde kalabilirler ve eğer immün yetmezlik söz konusu olursa diffüz pnömoni gelişebilir veya hematojen yol ile başta meninksler olmak üzere tüm dokulara yayılabilirler<sup>(4)</sup>.

**Tablo 1. Kriptokokkoz olguları.**

Yıl	Yaş	Cinsiyet	Altta yatan durum	BOS	BOS direkt bakışı	Kültür	Tedavi	Sonuç	
1	2005	29	K	HIV (+)	biyokimya	Kapsüllü maya mantarı	<i>C. neoformans</i> Kan ve BOS	-	Eksitus
2	2009	67	E	Yok	-	Kapsüllü maya mantarı	<i>C. neoformans</i> Kan ve BOS	Amfoterisin B	Eksitus
3	2010	67	K	Yok	Protein, glukoz, PNL, lenfosit yüksekliği	Kapsüllü maya mantarı	<i>C. neoformans</i> Kan ve BOS	Amfoterisin B	Şifa ile taburcu
4	2012	19	E	Yok	-	Kapsüllü maya mantarı	<i>C. neoformans</i> Kan ve BOS	Amfoterisin B	Eksitus
5	2012	45	K	HIV (+)	Protein ve PNL yüksekliği	Kapsüllü maya mantarı	<i>C. neoformans</i> Kan ve BOS	Amfoterisin B	Şifa ile taburcu
6	2015	33	K	2003 ve 2010 yıllarında tüberküloz ve anti-tüberküloz tedavi	Protein ve PNL yüksekliği Pansitopeni	-	<i>C. neoformans</i> BAL ve Kan	Amfoterisin B	Eksitus

\*PNL: Polimorf Nükleer lökosit; \*\*BAL: Bronko-Alveolar Lavaj; BOS: Beyin-Omurilik Sıvısı



*Cryptococcus neoformans* oldukça nörotropiktir ve en sık serebromeningeal kriptokokkoz olarak görülmektedir. Kriptokokkoz kronik hastalığa neden olabildiği gibi tedavi edilmezse mortaliteye neden olabilmektedir. Meninksler ve beyin dokusu etkilenmektedir. Klinik seyirde ateş, baş ağrısı, meningismus, görme bozuklukları, anormal mental durum ve nöbet görülmektedir. Hastanın bağışıklık durumuna bağlı olarak klinik değişebilmektedir. HIV pozitifliğinde ve immun sistemi baskılayıcı ilaç kullanımı olan hastalarda hastalık daha ciddi seyretmektedir<sup>(5)</sup>.

Çalışmamızdaki olgularda görüldüğü üzere *C. neoformans*, immun sistemi baskılanmış immun sistemi sağlam bireylerde hastalığa neden olabilmektedir. Thinyane ve ark.'nın<sup>(6)</sup> yaptığı çalışmada, HIV pozitif olan kriptokokal menenjitli olgularda ölüm oranı % 44 olarak belirtilmiştir. Mansoor ve ark.<sup>(7)</sup> karaciğer transplantasyonu olan hastada kriptokok menenjit olgusu bildirmişlerdir. Organ nakli, lenfomalar, glukokortikoid tedavisi alan hastalar, HIV enfeksiyonu ve diğer immün yetmezlikleri kriptokok enfeksiyonu için predispozan faktörlerdir. Ancak olguların %30'unda predispozan bir faktörün olmadığı da bildirilmektedir<sup>(8)</sup>. Newsome ve ark.<sup>(9)</sup> bağışıklık sistemi normal bir olguda kriptokok menenjitini bildirmişlerdir. Hastanın BOS kültüründe üreme ve lateks aglütinasyon testi pozitif olarak saptanmıştır. Hasta tedavi aldıktan sonra şifa ile taburcu edilmiştir. Sanchetee<sup>(10)</sup> immun sistemi sağlam beş kriptokokoz olgusu bildirmiştir.

Kurumumuzda kriptokokkoz açısından on iki yıl içinde altı olgunun saptanmıştır. Bu da bize etkenin çok sık karşılaşılmayan bir etken olduğunun göstermektedir. Bu nedenle ve kimi

zaman başlangıcının sinsi olması nedeniyle menenjit hastalarında ilk olarak düşünülmemektedir. Çalışmamızda da, iki hastada öncelikli olarak tüberküloz menenjiti düşünülmüştür. Kriptokok enfeksiyonlarında mortalite oranı yüksek olabilmektedir. Çalışmamızda sunduğumuz altı olgudan dördü kaybedilmiştir.

Kriptokokkozun yüksek mortalitesi ve gözden kaçabilme olasılığı nedeniyle menenjit düşünülen hastalarda akılda tutulması gereken bir etken olduğunu unutulmamalıdır.

## KAYNAKLAR

1. **Perfect JR.** *Cryptococcus neoformans*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Churchill Livingstone, 2005: 2997-3012.
2. **Kantarcıoğlu SA, Yücel A.** Türkiye'de insan Kriptokokkozunun epidemiyolojisi 1953-2003. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2003;34:95-109.
3. **Kaya O.** Kriptokok enfeksiyonları. *BAMCAG Bul* 2011; 2:51-6.
4. **İnci R.** Kriptokok enfeksiyonları. *Flora* 2008; 13:61-71.
5. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** Opportunistic mycoses. In: Medical Microbiology, 5<sup>th</sup> ed, Elsevier Mosby, 2005:787-9.
6. **Thinyane KH, Motsemme KM, Cooper VJL.** Clinical presentation, aetiology, and outcomes of meningitis in a setting of high HIV and TB Prevalence. *J Trop Med* 2015; 2015:423161. <https://doi.org/10.1155/2015/423161>
7. **Mansoor S, Juhardeen H, Alnajjar A, et al.** Hyponatremia as the initial presentation of cryptococcal meningitis after liver transplantation. *Hepat Mon* 2015; 15:e29902. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.29902>
8. **Sivrel-Arisoy A, Şahin Ş, Karabulut M, Eren-Topkaya A.** Bağışıklık sistemi normal bir olguda hidrosefali ile seyreden kriptokok meninjit. *İnfeksiyon Derg* 2006; 20:65-8.
9. **Newsome J, Nguyen D.** *Cryptococcal* meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* in an immunocompetent soldier. *Mil Med* 2014; 179:e1059-61. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00020>
10. **Sanchetee P.** *Cryptococcal* meningitis in immunocompetent patients. *J Assoc Physicians India* 1998; 46:617-9.

# KONU DİZİNİ

## Cilt/Volume 46, 2016

### A

*Acinetobacter baumannii*, 181  
Antibiyotik direnci, 97  
Antibiyotik kontrol ekibi, 128  
Antifungal duyarlılık, 63  
Antimikrobiyal direnç, 128  
Antinükleer antikor, 82  
Antisens antibakteriyaller, 51  
Antisens oligonükleotidler, 51  
Antitüberküloz duyarlılığı, 165

### B

Bağırsak parazitleri, 76  
Biyofilm, 18, 105  
Blefarit, 47  
BOS, 152

### C

*Candida albicans*, 69  
*Candida* türleri, 63  
Cerrahi yara, 128  
*Cryptococcus neoformans*, 189  
CTX-M, 88

### D

Demir direnci, 8  
Demodex sp, 47  
DFS paterni, 82  
Direnç, 135, 165

### E

Ekspresyon, 58  
Enfeksiyon modeli, 1

*Enterobacteriaceae*, 112

Epidemiyoloji, 27  
*Escherichia coli*, 88

### G

*Galleria mellonella* larvası, 1  
*Galleria mellonella*, 69  
Gen susturumu, 51  
Genomik, 147  
Genotip, 27  
Gıda intoksikasyonu, 122  
Gradient difüzyon test, 40  
GSBL üreten enterobacteriaceae, 33  
GSBL, 88

### H

Hazır yemek, 122  
HCR RNA, 27  
Hepatit B virüs, 135  
Hepatit C virüsü, 27  
Hızlı tarama testleri, 112  
HPV, 58  
Human papillomavirus, 58

### I

ICD kodları, 82

### İ

İmporte sıtma, 141  
İn vivo, 1  
İnfluenza virüsleri, 172  
İnsan mikrobiyomu, 147

### K

Kan kültürü, 63  
Karbapenem tedavisi, 33  
Karbapenem, 181  
Karbapenemaz üreten  
*Klebsiella* spp., 88  
Klonlama, 58  
Koagülaz negatif stafilokok, 18  
Kompleks hastalıklar, 147  
Kriptokokkoz, 189  
Kromojenik besiyeri, 40

### L

Lamivudin, 135  
Liberya, 141

### M

Manisa, 76  
Meningit, 189  
Multipleks PCR, 159  
Mutasyon, 135  
*Mycobacterium tuberculosis*, 165

### N

NDM/OXA-48/KPC, 112  
Nöroaminidaz, 18

### O

Oksasilin tarama testleri, 40  
Oksasilinazlar, 181

### P

*Plasmodium falciparum*, 141

PZR, 152

## Q

Q rt-PCR, 8

## S

*Saccharomyces cerevisiae*, 8

Salgısal asit proteinaz, 69

*Salmonella*, 105

Sefoksitin disk difüzyon, 40

Siprofloksasin, 105

Solunum virüsleri, 159

Solunum yolu enfeksiyonu, 159

*Staphylococcus aureus*

enterotoksin, 122

Sürveyans, 172

## T

Tanı, 47

Trikrom boyama, 76

## Ü

Ürosepsis, 33

## V

Viral SSS enfeksiyonu, 152

## Y

Yoğun bakım ünitesi, 97

Yolculuk, 141

# SUBJECT INDEX

## Cilt/Volume 46, 2016

---

- A**  
*Acinetobacter baumannii*, 181  
Antibiotic control team, 128  
Antibiotic resistance, 97  
Antifungal susceptibility, 63  
Antimicrobial resistance, 128  
Antinuclear antibody, 82  
Antisense antibacterials, 51  
Antisense oligonucleotides, 51  
Antituberculosis susceptibility, 165
- B**  
Biofilm, 18, 105  
Blepharitis, 47  
Blood culture, 63
- C**  
*Candida albicans*, 69  
Candida species, 63  
Carbapenem treatment, 33  
Carbapenem, 181  
Carbapenemase producing  
    *Enterobacteriaceae*, 112  
Cefoxitin disc diffusion, 40  
Chromogenic media, 40  
Ciprofloxacin, 105  
Cloning, 58  
Coagulase negative  
    staphylococci, 18  
Complex diseases, 147  
*Cryptococcosis*, 189  
*Cryptococcus neoformans*, 189  
CSF, 152
- CTX-M, 88
- D**  
Demodex spp., 47  
DFS pattern, 82  
Diagnosis, 47
- E**  
Epidemiology, 27  
ESBL producing  
    *enterobacteriaceae*, 33  
ESBL, 88  
*Escherichia coli*, 88  
Expression, 58
- F**  
Fast food, 122  
Food intoxication, 122
- G**  
*Galleria mellonella* larvae, 1  
*Galleria mellonella*, 69  
Gene silencing, 51  
Genomics, 147  
Genotype, 27  
Gradient diffusion test, 40
- H**  
HCV RNA, 27  
Hepatit B virus, 135  
Hepatitis C virus, 27  
HPV, 58  
Human microbiome, 147
- Human papillomavirus, 58
- I**  
ICD codes, 82  
Imported malaria, 141  
In vivo, 1  
Infection model, 1  
Influenza viruses, 172  
Intensive care unit, 97  
Intestinal parasites, 76  
Iron resistance, 8
- K**  
*Klebsiella* spp., 88
- L**  
Lamivudine, 135  
Liberia, 141
- M**  
Manisa, 76  
Meningitis, 189  
Multiplex PCR, 159  
Mutation, 135  
*Mycobacterium tuberculosis*, 165
- N**  
NDM/OXA-48/KPC, 112  
Neuraminidase, 18
- O**  
Oxacillin screening agar, 40  
Oxacillinases, 181

**P**

PCR, 152

*Plasmodium falciparum*, 141

**Q**

Q rt-PCR, 8

**R**

Rapid screening test, 112

Resistance, 135, 165

Respiratory tract infections, 59

Respiratory viruses, 159

**S**

*Saccharomyces cerevisiae*, 8

*Salmonella*, 105

Secretory acid proteinase, 69

*Staphylococcus aureus* enterotoxin,  
122

Surgical wound, 128

Surveillance, 172

**T**

Travel, 141

Trichrome staining, 76

**U**

Urosepsis, 33

**V**

Viral CNS infection, 152

# YAZAR DİZİNİ / AUTHORS INDEX

Cilt/Volume 46, 2016

## A

Acinikli H, 33  
Ağaçfidan A, 172  
Akkaya Y, 141  
Aktaş E, 33, 88  
Akyol R, 82  
Alakbarova G, 189  
Alkım C, 8  
Alp Çavuş S, 112  
Alpua Z, 141  
Altıntaş ZN, 69  
Altunay F, 40  
Alvandian A, 69  
Arslan A, 159  
Asar S, 172  
Aşçı Toraman Z, 58  
Aydemir Ş, 105  
Aydın E, 141  
Aydın N, 135  
Aygün Ünal N, 128

## B

Balaban BG, 8  
Balcıoğlu C, 76  
Baltacıoğlu Z, 105  
Baştemiz S, 76  
Bayramoğlu G, 82  
Birinci A, 189  
Bulut ME, 33  
Bulut Okut E, 47  
Bulut Y, 58

## C

Can Sarınoğlu R, 152  
Cömert F, 88

## Ç

Çağatay M, 128  
Çakar ZP, 8  
Çalışkan A, 63  
Çıragil P, 97  
Çiçek C, 159  
Çizmeci Z, 27  
Çöplü N, 128

## D

Demir-Dora D, 51  
Dengiz Ögedey E, 88  
Doğan M, 165  
Dökmetaş İ, 33  
Durupınar B, 181

## E

Ergen O, 40  
Esenkaya Taşbent F, 165  
Evren E, 40

## F

Felek R, 122

## G

Girginkardeşler N, 76  
Gülay Z, 112  
Gülen F, 159  
Gültekin Korkmazgil B, 135  
Gündoğdu A, 147  
Gür Vural D, 181

## H

Hamidi AA, 33  
Hortaç E, 40

Hoşgör-Limoncu M, 51, 105

## J

Jawadi MH, 69

## K

Kaklıkaya N, 82  
Karaman M, 1, 69  
Kasap B, 82  
Kırdar S, 135  
Kilimcioğlu AA, 76  
Kirişçi Ö, 63  
Kongur E, 82  
Köktürk F, 88  
Kuyucu U, 40  
Külah C, 88

## M

Meşe S, 172  
Mutlu D, 152

## O

Oğuz EO, 141

## Ö

Öcal D, 128  
Öğünç D, 152  
Öncel K, 76  
Önder Ş, 82  
Özhan Baysan B, 152  
Özkaya E, 63, 82  
Öztürk ŞB, 18  
Özyiğitoğlu D, 33

**S**

Sağlık İ, 152  
Sakarya S, 18  
Sarı AN, 112  
Saz EU, 159  
Seyrek A, 58  
Singer Ő, 128  
Soydaner Karakuş H, 159

**Ő**

Őengül M, 141

**T**

Tanrıverdi aycı Y, 189

TekintaŐ Y, 51

Topluođlu S, 141

Tuncer İ, 33

Turgay N, 47

Tümör S, 63

Tünger A, 105

**U**

Uyanık S, 172

Uzun Z, 141

**Ü**

Ünver A, 47

**Y**

YaŐa MH, 135

Yenen OŐ, 172

Yereli K, 76

Yıldırım İ, 122

Yıldız N, 69

Yıldız Sevgi D, 33

Yılmaz FF, 105

Yılmaz Ü, 8

**Z**

Zorbozan O, 47

# 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 görülmezsizin 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 Danışma Kurulundan veya konu ile ilgili kişilerden en az iki hakeme gönderilir ve hakemlerden yayına uygun olup olmadığı konusunda görüşleri alınır. Düzeltme isteniyorsa tekrar yazara gönderilir. Bu incelemeyen 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 yapılabildiği kadar, söz konusu yazılar yayın programında sırada bekletilir.
- Teslim edilmiş bir metnin tümünün veya bir bölümünün bir başka yerde yayımlanması söz konusu olursa editörlere bilgi verilmesi zorunludur.

## Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve teklif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak veya 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  
Kınıklı Kampüsü / Denizli  
Tel: 0258 296 2491  
E-posta: tmcdditor@gmail.com

## Metin Çeşitleri

- Metin çeşitlerinde on-line olarak yönlendirme bulunmaktadır
- **Özgün Araştırma:** Gerekli ve uygun sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 250 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; Türkçe ve İngilizce 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- **Derleme:** 1-4 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 200 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce Özetler; 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- **Olgu Sunumu:** Yeterli sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 20 kaynak; 200 sözcüğü geçmeyen İngilizce-Türkçe Özet; 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- **Editöre Mektup:** Daha önce yayımlanmış olan bir yazı hakkında, yeni bir araştırma bulgularının bildirilmesi veya bir görüş bildirimini olabilir. Bir şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik ve en çok 5 kaynak içerebilir.

## Metin yazımı esnasında uyulacak kurallar

- Yazının Türkçe başlığı kısa, açık ve içeriği tam yansıtır olmalıdır
- Yabancı dilde başlık Türkçe başlık ile birebir uyumalıdır
- On-line ilgili formlarda tüm aşamalar doldurulmalıdır
- Araştırma daha önce bir bilimsel toplantıda bildiri (sözlü veya poster) olarak sunulmuş ise, bu bilgi toplantının adı ve tarihiyle birlikte belirtilmelidir.
- 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.
- 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 adları 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.

- Bir teşekkür yazısı varsa Kaynaklar'dan önce olmalıdır.
- Çalışma kazanılmış bir burs veya proje ile tamamlanmışsa belirtilmelidir.
- 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, üst simge olarak yazılmalıdır. Örneğin; ..... gösterilmiştir<sup>(1,5,6)</sup>.....Kaynak yazımı sırasında boşluk bırakmayınız
- Metinde kaynaklar üst simge olarak bulunmalıdır
- Metinde kaynak verilirken yazar adı kullanılıyorsa kaynak numarası yazar adının yanına yazılmalıdır. Örneğin; Smith ve Gordon'a(4) göre ..... Kaynak yazımı sırasında boşluk bırakmayınız
- Henüz yayınlanmamış veriler ve çalışmalar Kaynaklar bölümünde yer almamalıdır.
- Dergimiz, başka çalışmalarda bildirilen kaynakların aktarma şeklinde kullanılmasını kabul etmemektedir. Yazarlar tarafından doğrulanmayan kaynaklara bağlı olarak çalışma değerlendirme dışı bırakılabilir.
- 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 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/>). Index Medicus'ta bulunmayan dergi adları kısaltılmadan yazılmalıdır.
- Dergide kaynaklar yazılırken aşağıdaki örnekler esas alınmalı; noktalama, kelime ve harf aralıkları, büyük harfler, dergi ve cilt numarası buna göre düzenlenmelidir.

## Örnekler

### A. Makaleler

Kaynak yazımlarında italik, boşluk, noktalama işaretleri kullanımına kesinlikle dikkat ediniz.

- 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 Infect 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 ulcer:

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: McGraw Hill Co, 2003. (Türkçe yazarlı kitaplarda da aynı format kullanılmalı, ancak 5<sup>th</sup> ed yerine 5. baskı denilmelidir). Bir kuruluş tarafından yayımlanmış olan kitaplarda basımevinin değil, yayımlanan kuruluşun adı ve varsa yayın numarası kullanılmalıdır. Örneğin "İst. Tıp. Fak. Yayın No. 20. İstanbul 1956" gibi.
- Kitap Bölüm: Cade AR, Gump WS. The bisphenols. In: Reddish GF, Davies J, eds. Antiseptics, Disinfectants and Fungicides. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1957:1657-9.
- Bildiri Özeti: Seyer A, Yaman M. Çeşitli besiyerlerinde *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. In: Ağaçfıdan A, Erturan Z eds. XI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı; 21-25 Ekim 2008; Antalya: Türkiye 2008:509.
- Tez: Küçüker M. Mikoplazmalar [doktora]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 1986.

### C. Sanal Ortam

- Web sitesi: World Health Organization. Global strategy for. Geneva: World Health Organization. 2001 [<http://www.who.international/>]. (Erişim tarihi: .....).

### Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

- 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.

Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler gibi dökümanlar başka bir yayından alıntı ise yazılı baskı izni mutlaka gönderilmelidir.

