

Cilt / Volume 47
Sayı / Number 1
Mart / March 2017

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516



Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✓ Kronik Hepatit B İçin Antiviral Tedavi Alan Hastalarda Antiviral İlaç Direncinin Araştırılması
- ✓ Türkiye'nin Orta ve Güney Anadolu İllerinde Yabani Kemiricilerde Hantavirüs Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Taranması
- ✓ Hepatit C Virus Enfeksiyonlu Hastalarda Pegile İnterferon-Ribavirin Tedavisi Yanıtı ile Kemokin Ligand ve Reseptör Düzeyleri İlişkisi
- ✓ Diyabetik Ayak Enfeksiyonlarında Etken Bakteriler ve Biyofilm Oluşturma Oranları

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY



Cilt / Volume 47

Sayı / Number 1

Mart / March 2017



TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 47 Sayı / Number 1 Mart / March 2017

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; Kastamonu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

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

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

Bedia Dinç; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

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

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

Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

Hakan Abacıoğlu (İzmir Ekonomi Üniversitesi)

Ali Kudret Adiloğlu (Bülent Ecevit Üniversitesi)

Mustafa Altındiş (Sakarya Üniversitesi)

İmre Altuğlu (Ege Üniversitesi)

Şöhret Aydemir (Ege Üniversitesi)

Asuman Birinci (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Şahin Direkel (Giresun Üniversitesi)

Fahriye Ekşi (Gaziantep Üniversitesi)

Ebru Evren (Ankara Üniversitesi)

Ceren Karahan (Ankara Üniversitesi)

Murat Kutlu (Pamukkale Üniversitesi)

Canan Külâh (Bülent Ecevit Üniversitesi)

Mine Hoşgör Limoncu (Ege Üniversitesi)

Feza Otağ (Mersin Üniversitesi)

Müşerref Tatman Otkun (Çanakkale Üniversitesi)

Fatih Şahiner (Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

Nur Yapar (Ege Üniversitesi)

Atila Yıldız (Ankara 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: tmcddeditor@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

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS

- **Kronik Hepatit B İçin Antiviral Tedavi Alan Hastalarda Antiviral İlaç Direncinin Araştırılması**
Investigation of Antiviral Drug Resistance in Patients Receiving Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B
Demet TİMUR, Selma ÖKAHMETOĞLU, Osman ÖZÜBERK, Gülten CAN SEZGİN, Ömür Mustafa PARKAN, Özge KAAN **1-5**
- **Türkiye'nin Orta ve Güney Anadolu İllerindeki Yabani Kemiricilerde Hantavirüs Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Taranması**
The Serological Screening of Wild Rodents for Hantavirus Infections in the Middle and Southern Anatolia Region of Turkey
Ceylan POLAT, Mert ERDİN, Mehmet Ali ÖKTEM **6-10**
- **Hepatit C Virus Enfeksiyonlu Hastalarda Pegile İnterferon-Ribavirin Tedavisi Yanıtı ile Kemokin Ligand ve Reseptör Düzeyleri İlişkisi**
Relationship Between Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Response and Chemokine Ligand and Receptor Levels in Hepatitis C Virus Infected Patients
Orçun ZORBOZAN, İlknur KALELİ, Hüseyin TURGUT **11-20**
- ***Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Escherichia coli* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçlarının EUCAST ve CLSI'ya Göre Yorumlanması: Hacettepe Deneyimi**
*Interpretation of Antibiotic Susceptibility Test Results of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* Isolates According to EUCAST and CLSI: Hacettepe Experience*
Salih MAÇIN, Yakut AKYÖN YILMAZ, Özben ÖZDEN, Deniz GÜR **21-25**

• Balıkesir Bölgesinden Toplanan Liken Örneklerine Ait Özütlere <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri <i>Antibacterial Activities of Extracts of Lichen Samples Collected from Balıkesir Region on Escherichia coli</i> Ezgi UÇARKUŞ, Barış GÖKALSIN, Nazlıhan YILDIRIM, Birkan AÇIKGÖZ, Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU, N. Cenk SESAL	26-32
• Diyabetik Ayak Enfeksiyonlarında Etken Bakteriler ve Biyofilm Oluşturma Oranları <i>Bacterial Agents in Diabetic Foot Infections and Their Biofilm Formation Rates</i> Ş. Barçın ÖZTÜRK, M. Bülent ERTUĞRUL, Esra ÇÖREKLİ	33-38
• Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> Suşlarında Vankomisine Karşı Azalmış Duyarlılığın Araştırılması <i>Investiation of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains</i> Emine KORKUT TUNÇ, Çiğdem KUZUCU, Barış OTLU	39-46
YAZARLARA BİLGİ	V-VI

Kronik Hepatit B İçin Antiviral Tedavi Alan Hastalarda Antiviral İlaç Direncinin Araştırılması[§]

Demet TİMUR*, Selma ÖKAHMETOĞLU**, Osman ÖZÜBERK**, Gülten CAN SEZGİN***, Ömür Mustafa PARKAN****, Özge KAAAN**

*Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Kayseri

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

***Kilis Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Kilis

****Afşin Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Kahramanmaraş

ÖZ

Amaç: Kronik hepatit B (KHB) tedavisinde günümüzde interferon/pegile interferon ve çeşitli nükleozid/nükleotid analogları kullanılmaktadır. Tedavideki nükleozid analogları; lamivudin, entekavir ve telbivudin iken, tenofovir ve adefovir ise nükleotid analoglarıdır. Ancak nükleozid/nükleotid analoglarının kullanımı ile viral polimeraz geninin çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar antiviral direncine neden olarak ilacın etkinliğini azaltmaktadır. Bu çalışmada, KHB enfeksiyonu tanısı ile takip edilen hastalarda, ilaç direncinden sorumlu gen mutasyonların araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi poliklinik ve kliniklerinde KHB tanısı ile takip edilen 45 hasta çalışmaya dâhil edildi. KHB hastalarında ilaç direncinden sorumlu mutasyonları revers transkriptaz gen bölgesinde pirosekanslama yöntemi (Pyromark, Qiagen, Almanya) ile araştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 45 hastanın 13 (% 28.8)'ünde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptandı. Dört örnekte M204I, 4 örnekte L180M+M204I, 2 örnekte L180M+M204V+V173L, 3 örnekte L180M+M204V mutasyonları bulundu. Bu mutasyonlar, M204I; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve adefovire orta duyarlı, tenofovire ise duyarlı, L180M+M204I; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+M204V+V173L; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+M204V; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve adefovire orta duyarlı, tenofovire duyarlı olarak raporlandı. Hastaların tedavisi antiviral ilaç direnç sonuçlarına göre planlandı.

Sonuç: KHB hastalarının tedavi takibinde antiviral ilaç direnç analizinin yapılması gerektiği düşüncesine varıldı.

ABSTRACT

Investigation of Antiviral Drug Resistance in Patients Receiving Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B

Objective: Today in the treatment of chronic hepatitis B (CHB) treatment, interferon/pegylated interferon and several nucleoside/nucleotide analogues are used. Nucleoside analogues used in the treatment are lamivudine, entecavir and telbivudine whereas tenofovir and adefovir are the nucleotide analogues in use. However, mutations in various regions of viral polymerase gene due to use of nucleoside/nucleotide reduce the effectiveness of the drug, analogues by inducing antiviral resistance. In this study investigation of the mutations responsible for drug resistance in patients with CHB infection was aimed.

Material and Methods: Forty-five patients who were being followed with the diagnosis of CHB in polyclinics and clinics of Erciyes University Medical Faculty were included in the study. Mutations responsible for drug resistance in reverse transcriptase gene region were investigated by pyrosequencing method (Pyromark, Qiagen, Germany).

Results: Mutations related to drug resistance were detected in 13 of 45 patients. M204I and L180M+M204I, mutations were detected in four samples each, L180M+M204V+V173L and L180M+ M204V mutations in two and three samples respectively. These mutations were reported as follows: M204I; resistant to telbivudine and lamivudine, intermediately susceptible to entecavir and adefovir, and susceptible to tenofovir, L180M+M204I; resistant to lamivudine, telbivudine and entecavir, susceptible to adefovir, tenofovir, L180M+M204V+V173L; resistant to lamivudine, telbivudine and entecavir, susceptible to adefovir, tenofovir, L180M+M204V; resistant to telbivudine and lamivudine, intermediately susceptible to entecavir and adefovir, and susceptible to tenofovir. Treatment of patients was carried out according to the antiviral drug resistance results.

Conclusion: It has been concluded that analysis of antiviral drug resistance should be performed in patients with CHB.

Anahtar kelimeler: Antiviral direnç, kronik hepatit B

Keywords: Antiviral drug, chronic hepatitis B

Alındığı tarih: 03.10.2016

Kabul tarihi: 15.01.2017

Yazışma adresi: Demet Timur, Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Kayseri

e-posta: drdtimur@hotmail.com

[§] Bu çalışma 1. Ulusal Viroloji Günleri'nde (26-28 Şubat 2016, Ankara) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonları, uzun süredir etkin bir aşının yaygın olarak uygulanmasına rağmen, günümüzde siroz ve hepatosellüler karsinoma (HCC)'ya kadar ilerleyerek insan hayatını riske atmaya devam etmektedir^(1,2). Türkiye orta endemik bölgeler içerisinde yer almaktadır⁽³⁾. Genotip D ülkemizde en sık rastlanan HBV genotipidir⁽⁴⁾.

Günümüzde kronik hepatit B (KHB) tedavi seçenekleri interferon/pegile interferon ve çeşitli nükleozid/nükleotid analoglarıdır⁽⁵⁾. Tedavideki nükleozid analogları; lamivudin, entekavir ve telbivudin iken, tenofovir ve adefovir ise nükleotid analoglarıdır⁽⁶⁾. Ancak nükleozid/nükleotid analoglarının kullanımı ile viral polimeraz geninin çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar antiviral direncine neden olarak ilacın etkinliğini azaltmaktadır⁽⁷⁾. Oral antiviral olarak kullanılan lamivudinin uzun süreli kullanımı sonucunda mutant suşlar ortaya çıkmaktadır. Dirençli mutantlar 4-5 yıllık bir sürede %60 oranına kadar ulaşabilmekte ve bu durum virolojik yanıt oranının düşmesiyle sonuçlanmaktadır⁽⁶⁾. Bu çalışmada, KHB enfeksiyonu tanısı ile takip edilen hastalarda, ilaç direncinden sorumlu gen mutasyonlarının araştırılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi poliklinik ve kliniklerinde KHB tanısı ile takip edilen, yaşları 7-69 arasında değişen ve 15'i kadın, 30'u erkek olan 45 hasta çalışmaya dâhil edilmiştir. KHB hastalarında ilaç direncinden sorumlu mutasyonları revers transkriptaz gen bölgesinde pirosekanslama yöntemi (Pyromark, Qiagen, Almanya) ile araştırıldı.

DNA İzolasyonu

Hastalara ait serum örneklerinden deoksiribo-

nükleik asit (DNA) izolasyonu EZ1 virus mini kit v2.0 (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda EZ1 Advanced XL (Qiagen, Almanya) otomatik nükleik asit izolasyon cihazında yapıldı.

PCR Amplifikasyonu

HBV DNA amplifikasyonunda iki polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) karışımı hazırlandı. Master A ve B kullanılarak hazırlanan "master" karışımdan 20 µl her DNA örneğinden 10 µl alınıp; Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında PCR amplifikasyonu yapıldı.

Pirosekanslama

HBV antiviral direnç analizi pirosekanslama yöntemi (Qiagen, Almanya) ile araştırıldı. HBV antiviral direnç analizi için, örnek başına altı pirosekanslama reaksiyonu uygulandı. PCR ürünlerinin "streptavidin sepharose" boncukları ile karşılaştırma işlemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı, örnekler denatüre edildi. Elde edilen tek sarmal DNA ile sekans primerinin bağlanma işlemi gerçekleştirildi. Altı adet sekans primeri kullanıldı ve 169, 173; 180, 181, 184; 194; 202, 204; 236; 250 kodonlarındaki antivirallere ait direnç mutasyonları belirlendi. Pyromark Q24 cihazında analiz işlemleri tamamlandı ve HBV antiviral sonuçları belirlendi. Antiviral ilaç direnç sonuçları Avrupa Karaciğer Derneği önerileri doğrultusunda değerlendirildi⁽²⁾.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 45 hastanın 13 (% 28.8)'ünde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptandı. Bu 13 hastanın dördünde (%31) M204I, dördünde (%31) L180M+M204I, ikisinde (%15) L180M+M204V+V173L, üçünde (%23) L180M+M204V mutasyonları bulundu. Bu mutasyonlar, M204I; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve

Tablo 1 Hastalarda saptanan antiviral ilaç direnç paternleri, önceden verilen tedaviler ve dirençle eşzamanlı laboratuvar değerleri.

Direnç paterni	Hasta sayısı	Tedavi	AST/ALT	HBV DNA(IU/ml)	HbeAg
M204I	1. hasta	Lamivudin	17/19	629	(-)
	2. hasta	Lamivudin	132/219	10500	(+)
	3. hasta	Lamivudin	33/33	49063719	(+)
	4. hasta	Belirlenemedi*	20/11	18320	(-)
L180M+M204I	1. hasta	lamivudin	16/15	1760000	(-)
	2. hasta	lamivudin	40/54	20200000	(+)
	3. hasta	lamivudin	27/42	70432410	(+)
	4. hasta	lamivudin	38/43	6005	(-)
L180M+M204V+V173L	1. hasta	lamivudin	28/60	>100000000	(+)
	2. hasta	lamivudin	30/67	>100000000	(+)
L180M+M204V	1. hasta	lamivudin	1036/923	>100000000	(-)
	2. hasta	lamivudin	21/26	138000	(-)
	3. hasta	lamivudin	28/99	264112203	(-)

* Hastaya ait dosyada ilaç raporu bulunamamıştır.

adefovire orta duyarlı, tenofovire ise duyarlı, L180M+ M204I; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+ M204V+V173L; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+M204V; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve adefovire orta duyarlı, tenofovire duyarlı olarak raporlandı. Bu hastaların direnç paternleri, önceden verilen tedaviler ve dirençle eşzamanlı laboratuvar değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Hastaların tedavisi antiviral ilaç direnç sonuçlarına göre yapılmıştır.

M204I mutasyonu saptanan pediatrik hastada, lamivudin direnci geliştikten sonra tedavisine interferonla devam edilirken, lamivudine direnç belirlenen geriye kalan 9 hastanın tedavisine tenofovir ile devam edilmiştir.

Antiviral direnç analizi sonucunda L180M+M204V ve L180M+M204I mutasyonu saptanan iki hasta eksitus olduğu için sonraki tedavileri bilinmemektedir.

TARTIŞMA

KHB tedavisinde pegile interferon, yüksek etkinliği ve kullanım süresinin sınırlı olması

nedeniyle standart interferonların yerini almıştır. Pegile interferon ile tedaviye yanıt hızlarının yüksek olmasına karşın, uzun süreli izlemde relaps oranlarının fazla olduğu saptanmıştır⁽⁸⁾. Deri altına enjeksiyon şeklinde uygulanması ve yan etkilerinin sık görülmesi dezavantajlarını oluşturmaktadır. Dekompanse HBV ile ilişkili siroz veya otoimmün hastalığı olan kişilerde, kontrolsüz şiddetli depresyon ya da psikoz hastalarında ve gebelikte pegile interferon kullanımı kontrendikedir.

Entekavir ve tenofovir güçlü HBV inhibitörüdür ve direnç gelişimine yatkın değildir. İlk sırada kullanılabilecek monoterapi tedavi seçeneği olarak güvenle kullanılabilir. Adefovir tenofovirde daha pahalı, daha az etkilidir ve daha çok dirence neden olur. Telbivudin güçlü bir tedavi seçeneğidir, ama tedavi başarısı HBV DNA viral yükünden etkilenmektedir⁽²⁾.

Lamivudin tedavisinin maliyeti uygundur, ancak uzun süreli monoterapi tedavisi lamivudin dirençli HBV mutantlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dirençli mutantlar 4-5 yıllık bir sürede %60 oranına kadar ulaşabilmekte ve bu durum virolojik yanıt oranının düşmesiyle sonuçlanmaktadır⁽⁶⁾. Primer yanıtsızlık duru-

munda uyumlu bir hastada antiviral direnç araştırılmaktadır. Dirençli bir varyantın saptanması durumunda bu varyanta etkili olan diğer potent antivirale geçilmektedir. Benzer durumda tedaviye uyumlu olan hastalardaki virolojik kırılma durumunda direncin genotipik olarak tayini önerilmektedir. Günümüzde tenofovir direncine rastlanmamıştır. Tenofovir direncinin saptanması durumunda referans bir laboratuvarla doğrulanması gerekmektedir⁽²⁾.

Aydoğan ve ark.⁽⁹⁾ Ankara’da bir üniversite hastanesinde yaptıkları çalışmada, 51 örneğin 13’ünde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlar, dört örnekte L180M+M204I ve bir örnekte L180M+M204V, üç örnekte M204I, bir örnekte L180M+M204V+S202G ve iki örnekte N236T şeklinde izlenmiştir⁽⁹⁾. Çalışmamızda ise, 45 hastanın 13’ünde (%28.8) ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptanmış olup, öncesinde 12’sinin lamivudin tedavisi almış olduğu belirlenmiştir. On üç hastanın yedisinde (%54) LMV ve telbivudin direnci ile ilişkili mutasyonlar, dördünde (%31) M204I, üçünde (%23) L180M+M204V, altısında (%46) LMV, telbivudin ve entekavir direnci ile ilişkili mutasyonlar, dördünde (%31) L180M+M204I, ikisinde (%15) L180M+M204V+V173L) bulunmuştur.

Akhan ve ark.⁽¹⁰⁾ beş yıllık süredeki kronik hepatit B enfeksiyonu tedavisi gören 583 hastaya retrospektif olarak genotiplendirme ve direnç analizi yapmıştır. Çalışmaya dâhil edilen 167 hastanın dokuzunda lamivudin direnci, üçünde adefovir direnci ve birinde adefovir ile lamivudin direnci saptanmıştır⁽¹⁰⁾.

Kırdar ve ark.⁽¹¹⁾ bir yıl lamivudin tedavisi kullanmış, kronik hepatitli 50 hastanın 12’sinde (%24) lamivudin direnci saptanmıştır. On iki hastanın altısında (%50) tek başına M204I mutasyonu, dördünde (%33) L180M+ A181T mutasyonları tek başına ya da M204I ile birlikte,

iki hastada (%16.7) M204I ile birlikte kompensatuvar mutasyonlardan L180M belirlenmiştir⁽¹¹⁾.

Çin’de 2. basamak bir hastanede entekavir tedavisi sırasında takip edilen 81 hastanın 18’inde pirosekanslama yöntemi ile altı adet LMV direnci ile ilişkili çoklu mutasyon (L180M+M204V), 10 adet LMV direnci ile ilişkili tekli mutasyon (sekiz adet M204V, iki adet M204I), bir adet adefovir direnci ile ilişkili mutasyon (A181V) ve bir adet entekavir direnci ile ilişkili mutasyon (L169T+M204V+M250V) bulunmuştur⁽⁶⁾.

İtalya’da 38 kronik hepatit B hastasında lamivudin direnci M204I tek başına (7/17, %41), kompensatuvar mutasyonlar ile birlikte ikili mutasyonlar M204V+L180M (3/17, %17.6) ve üçlü mutasyonlar M204V+L180M+V173L (2/17, %11.7) olarak bulunmuştur⁽¹²⁾. Bu çalışmada, adefovir direnci ile ilişkili bulunan mutasyonlar Q215S, A181V, N236T ve V214E’dir⁽¹²⁾. Bu mutasyonlardan tekli olanlar dokuz hastada, ikili olanlar beş hastada ve üçlü olanlar üç hastada saptanmıştır. A194T ile ilişkili tenofovir direnci bir hastada bulunmuştur⁽¹²⁾.

Sonuç olarak, KHB tedavisi sırasında antiviral ilaç direnci düşünülen 45 hastanın 13’ünde antiviral ilaç direnci saptanmış olup, tedavi buna göre yönlendirilmiştir. KHB tedavi protokolü hastadan hastaya değişmekte olup, tedavi takibinde antiviral ilaç direnç analizinin yapılması gerekliliği düşüncesine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lee GH, Inoue M, Toh JK, et al. Two-step evolution of the hepatitis B drug-resistant mutations in a patient who developed primary entecavir resistance. *Liver Int* 2013; 33:642-6. <https://doi.org/10.1111/liv.12104>
2. European association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57:167-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.010>
3. Emekdaş G, Cavuşlu S, Öncül O, Cigdem A,

- Armagan A.** Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. *Eur J Epidemiol* 2006; 2:299-305.
4. **Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, et al.** Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004; 149:2115-29. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0363-2>
5. **Petersen J, Thompson AJ, Levrero M.** Aiming for cure in HBV and HDV infection. *J Hepatol* 2016; 65:835-48. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.043>
6. **Sun M, Tan G, Song J, Wang J, Wu X.** Profile of HBV polymerase gene mutations during entecavir treatment in patients with chronic hepatitis B. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2016; 40:590-6. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2016.02.005>
7. **Ergünay K, Kahramanoğlu Aksoy E, Şimşek H ve ark.** Tedavi naif kronik hepatit B olgularında bazal antiviral direncin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:628-35. <https://doi.org/10.5578/mb.6192>
8. **Akhan S, Aynioğlu A, Çağatay A, ve ark.** Kronik hepatit B virüsü enfeksiyonunun yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği viral hepatit çalışma grubu uzlaşısı raporu. *Klinik Derg* 2014; 27(Suppl):S2-18. <https://doi.org/10.5152/kd.2014.26>
9. **Aydoğan S, Ergünay K, Balaban Y, ve ark.** Bir yıldan uzun süreli antiviral ilaç kullanan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:472-81. <https://doi.org/10.5578/mb.5625>
10. **Akhan S, Gürel E, Sayan M.** Kronik hepatit B hastalarının beş yıllık tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi. *Klinik Derg* 2009; 22:82-7.
11. **Kırdar S, Yaşa MH, Aydın N, Gültekin Korkmazgil B.** Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının moleküler yöntem ile belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2016; 46:135-40.
12. **de Francesco MA, Gargiulo F, Spinetti A, et al.** Clinical course of chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide analogues after virological breakthrough during monotherapy with lamivudine. *New Microbiol* 2015; 38:29-37.

Türkiye'nin Orta ve Güney Anadolu İllerindeki Yabani Kemiricilerde Hantavirüs Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Taranması

Ceylan POLAT*, Ferhat MATUR**, Mustafa SÖZEN***, Mehmet Ali ÖKTEM*

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

**Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir

***Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak

ÖZ

Amaç: Hantavirüsler, enfekte kemirici ve bazı böcekçilere ait sekresyonlardaki viral partiküllerin solunması yolu ile insanlara bulaşmaktadır. Renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) etkeni olan Hantavirüs alt tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) virüslerin taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türleri ülkemizde de yayılım göstermektedir. Hantavirüs enfeksiyonlarında grip benzeri bulguların görülmesi ve hastalığın hızla ilerlemesi, erken tanı konulmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle saha çalışmaları ile alandaki Hantavirüs prevalansı belirlenmekte ve olası salgın bölgeleri öngörülerek, bölgedeki halk ve yetkili kişiler önceden uyarılabilmektedir. Bu çalışmada, saha araştırması ile bölge taraması yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma ile Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay illerinden yakalanan *Apodemus* spp., *Microtus* spp. ve *Mus* spp. türlerinden 193 kemiriciye ait serum örnekleri serolojik olarak tarandı.

Bulgular: Bu kemiricilerde Hantavirüse özgül antikor varlığı saptanmadı.

Sonuç: Türkiye'de Hantavirüs açısından taranmamış pek çok bölge bulunmaktadır. Yapılacak yeni çalışmalar ile diğer bölgelerde Hantavirüs prevalansının ve bölgelerin risk durumunun belirlenmesi önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Hantavirüs, kemirici, seroloji

ABSTRACT

The Serological Screening of Wild Rodents for Hantavirus Infections in the Middle and Southern Anatolia Region of Turkey

Objective: Hantaviruses infect humans via inhalation of the viral particles in the secretions of some rodents and insectivores. The rodent species which known as reservoirs of Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) and Seoul (SEOV) viruses of Hantavirus subtypes which cause hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) are also found in Turkey. Early diagnosis of Hantavirus infections is difficult, because of the flu-like symptoms and rapid progression of the disease. However, the prevalence of hantavirus seropositivity in rodents from the field works could predict and warn authorities for possible human outbreaks. In this study field research and regional screening were aimed.

Material and Methods: In the present study serum samples of 193 rodents of *Apodemus* spp., *Microtus* spp. and *Mus* spp. collected from Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay Provinces were screened using serological methods.

Results: The presence of antibody against Hantaviruses were not detected in these rodents.

Conclusion: There are a large number of geographical areas in Turkey that have not screened for hantaviruses. Determination of Hantavirus prevalence and the risk status of other regions in further studies to be performed conveys importance.

Keywords: Hantavirus, rodent, serology

GİRİŞ

Hantavirüs cinsi, *Bunyaviridae* ailesindeki beş

cinsten biri olup, "International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)" 2015 yılı verilerine göre 24 tür içermektedir. Hantavirüsler, tek

Alındığı tarih: 19.01.2017

Kabul tarihi: 04.03.2017

Yazma adresi: Ceylan Polat, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir

e-posta: ceylanpolat88@gmail.com

iplikli, negatif polariteli, üç segmentli genoma sahip zarflı RNA virüsleridir. Renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirüs pulmoner sendrom (HPS) gibi klinik tablolar oluşturmaları nedeniyle tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hantavirüsler, kemiriciler ve bazı böcekçiller ile taşınmaktadır⁽¹⁾. İnsanlara bulaş, enfekte kemirici ve böcekçillere ait sekresyonlardaki (dışkı, idrar, tükürük vb.) viral partiküllerin solunması yolu ile gerçekleşmektedir⁽¹⁾. Her bir hantavirüs tipi, belli bir kemirici türü ile taşındığından, etkenlerin yayılım alanları da bu kemiricilerin yayılım alanları ile sınırlı kalmaktadır⁽¹⁾. Bu nedenle RSKA olguları Avrasya'da görülürken, HPS olguları Amerika'da görülmektedir⁽²⁾.

RSKA etkeni olan hantavirüs alt tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) virüslerin taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türlerinden *Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus*, *Apodemus agrarius*, *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus* ülkemizde de yayılım göstermektedir⁽³⁻⁶⁾. Şimdiye kadar hem RSKA şüphesi olan hastalara ait serum örnekleri ile hem de kemiricilere ait doku ve serum örnekleri ile yapılan çalışmalarda, Hantavirüs enfeksiyonları gösterilmiştir⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Hantavirüs enfeksiyonlarında, enfeksiyona neden olan hantavirüs tipine bağlı olarak, yüksek mortalite oranları görülebilmektedir. Bu nedenle erken tanı koyulması önem taşımaktadır. Ancak hastalığın grip benzeri bulgular vermesi, erken dönemde tanı koyulmasını güçleştirmektedir. Ayrıca virüse karşı doğrudan etkili bir antiviral ajan da bulunmadığından enfeksiyondan korunma daha da önem kazanmaktadır. Yapılan saha çalışmaları ile yaban yaşamındaki kemirici popülasyonlarında enfeksiyonun takibi sağlanmakta, alandaki Hantavirüs prevalansı belirlenmekte ve olası salgın bölgeleri öngörülebilmektedir. Ancak kemiricilere ait örneklerin

DOBV ve PUUV gibi Avrasya'da sık görülen ve ülkemizden de bildirilen RSKA etkenleri açısından serolojik olarak taranmasında kullanılabilecek bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle insan serumlarının taranması için üretilmiş, ticari enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) ve immunoblot testleri, Polat ve ark.^(11,12) tarafından kemirici örneklerinde hantavirüse özgül antikorların taranmasına uygun olarak optimize edilmiştir.

Bu çalışma ile Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay illerinden yakalanan, farklı türlerden 193 kemiriciye ait serum örnekleri, optimize edilen ELISA testi ile^(11,12) taranmış ve immunoblot testi ile ülkemizde de görülen PUUV, DOBV ve Asya'da RSKA olgularına neden olan Hantaan virüse (HTNV) özgül antikor varlığı açısından değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun onayı (19.08.2014 tarih ve 15/2014 no'lu karar) ile gerçekleştirildi.

Kullanılan Örnekler: Kemiriciler, hayvanları canlı olarak yakalamayı sağlayan "Sherman" tipi kapan tuzaklar ile 2015-2016 yıllarında Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin ve Hatay illerinde yapılan arazi çalışmaları sırasında toplandı. Kemiricilerin tür tayinleri, arazi çalışmaları sırasında fenotipik olarak yapıldı. Çalışma sırasında kemiricilerin serum örnekleri kullanıldı. Pozitif (DOBV ve PUUV) ve negatif kontrol olarak kullanılan kemirici serum örnekleri, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan temin edildi.

Kemirici Serumlarının ELISA ile Taranması: Hantavirüse karşı antikor varlığının belirlenmesi için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı ELISA plakları

(Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Örnekler, Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından kemirici serumlarına göre optimize edilen prosedür uygulanarak tarandı.

Her bir kuyucuğa 100 µL 1/50 oranında fosfatlı tampon (PBS) ile seyreltilen serum örneği eklendi ve her bir örnek için çift kuyucuk kullanıldı. Plak, 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra boşaltılan kuyucuklar, deterjan içeren yıkama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile üçer kez yıkandı. Yıkama sırasında her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanıldı ve 30 saniye hafifçe çalkalandı. Yıkama sonrasında boşaltılan kuyucuklara, 100 µL 1/10.000 oranında PBS ile seyreltilmiş horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore, ABD) eklendi. Plak, 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra yukarıda anlatılan şekilde yine yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µL 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit (TMB/H₂O₂) kromojen/substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 100 µL 0.5 M sülfirik asit (H₂SO₄) eklendi. Örneklerin optik dansiteleri (OD), 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçüldü.

Kemirici Serumlarının İmmunoblot ile Doğrulanması: Hantavirüse karşı antikor varlığının doğrulanması için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş immunoblot şeritleri (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. ELISA sonuçları, Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından kemirici serumlarına göre optimize edilen immunoblot prosedürü uygulanarak doğrulandı. İmmunoblot şeritleri, inkübasyon tepsisine yerleştirilip, 1.5 ml bloklama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında inkübasyon tepsisinde bulunan sıvı aspire edildikten sonra, her bir örneğe ait şerit üzerine 1.5

ml 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu (Euroimmun, Almanya) ile seyreltilen kemirici serumu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Serum örnekleri aspire edildikten sonra üçer kez beşer dakika 1.5 ml 1x dilüsyon tamponu ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında 1.5 ml 1/5.000 oranında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen alkalen fosfataz (AP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Santa Cruz Biotechnology, ABD) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yukarıda anlatılan şekilde yeniden yıkama yapıldı. Her bir şerit üzerine 1.5 ml NBT/BCIP (nitrobluetetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir şerit, üçer kez birer dakika distile su ile yıkandı. İmmunoblot şeritleri üzerindeki bant yoğunlukları, şeritler kuruduktan sonra değerlendirildi.

BULGULAR

Yakalanan Kemiriciler: Çalışma sırasında yakalanan 193 kemiriciden 89'u *Apodemus* spp. (%46.1), 55'i *Microtus* spp. (%28.5) ve 49'u *Mus* spp. (%25.4) olarak belirlendi.

Kemirici Serumlarının Serolojik Test Sonuçları: Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından optimize edilen prosedüre göre OD değeri 0.326 ve üzerinde olan örnekler, pozitif olarak değerlendirildi. Sekiz ilden toplanan 193 kemiriciden 33'ünde (%17.1) hantavirüs açısından düşük seropozitiflik (saptanan en düşük OD değeri 0.326 ve en yüksek OD değeri 0.846) saptandı. Bu kemiricilerden 18'i (% 54.5) *Mus* spp. ve 15'i (%45.5) *Apodemus* spp. türlerindendi.

Seropozitif olarak belirlenen kemiricilere ait serum örneklerinin tümü, immunoblot testi ile negatif olarak saptandı.

TARTIŞMA

Hantavirüs enfeksiyonları, enfekte kemirici ve böcekçillerin sekresyonlarındaki viral partiküllerin solunması ile insanlara bulaşmaktadır. Kemiricilerde kronik bir enfeksiyona neden olan virüs, viral partikülleri içeren sekresyonlar ile ömür boyu çevreye saçılırken, enfekte kişilerde akut enfeksiyon sonucunda RSKA ve HPS gibi mortalitesi yüksek klinik tablolara neden olabilmektedir. Bu nedenle Hantavirüs enfeksiyonlarından korunabilmek için, alandaki Hantavirüs prevalansının ve olası salgın bölgelerinin belirlenmesi önem taşımaktadır⁽¹⁾.

Hantavirüslerin Türkiye'deki yaban yaşamı kemiricilerindeki varlığı ilk kez 2004 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir⁽⁷⁾. Türkiye'deki ilk Hantavirüs salgını ise 2009 yılında Batı Karadeniz bölgesindeki RSKA olgular ile bildirilmiştir^(8,9). Bu salgının ardından aynı bölgede gerçekleştirilen saha çalışmaları ile Türkiye'deki kemiricilerde ilk kez PUUV izolasyonu gerçekleştirilmiş ve DOBV varlığı gösterilmiştir⁽¹⁰⁾.

Kemiricilerin serolojik olarak taranabilmesini sağlayacak testlerin varlığı, saha çalışmaları sırasında yakalanan kemiricilerin hızlıca taranarak, birkaç saat içerisinde sonuç alınmasını ve elde edilen veriler ışığında saha çalışmasının yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Ancak Avrasya'da sık görülen ve ülkemizden de bildirilen RSKA etkenleri açısından kemiricilerin serolojik olarak taranmasında kullanılabilecek bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle, Polat ve ark.^(11,12) tarafından insan serumlarında Hantavirüse özgül antikor varlığının araştırılması amacıyla üretilmiş, ticari ELISA ve immunoblot testleri (Euroimmun, Almanya), kemirici örneklerinin taranabilmesi için optimize edilmiştir. Bu çalışmada da, kemirici serumlarının taranması için optimize edilmiş olan ELISA ve immunoblot yöntemleri

uygulanmıştır⁽¹²⁾.

Serolojik taraması yapılan 193 kemiricide hantavirüs antikor varlığı saptanamamıştır. Pozitif kontrol örneklerinde saptanan OD değerleri 1.000 ve üzerinde olduğundan, eşik OD değeri 0.326 olan ELISA testi ile 33 kemiricide (33/193) düşük düzeyde seropozitiflik (saptanan en düşük OD değeri 0.326 ve en yüksek OD değeri 0.846) saptanmıştır. Ancak immunoblot yöntemi ile doğrulanamamıştır. Bunun nedeni, ELISA için belirlenen eşik değerinin taraması yapılan kemirici türleri için düşük kalmış olabileceğidir. Bu yüzden örnekler, yalnızca ELISA testi sonucuna göre negatif ya da pozitif olarak değerlendirilmemiş, altın standart olarak kabul edilen immunoblot testi de dikkate alınmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen kemiricilerin bir kısmının yakalandığı illerden olan Konya, Aksaray ve Hatay'dan RSKA olguları bildirilmiştir. Ancak bu illerden yakalanan kemiricilerde seropozitiflik saptanamamıştır. Bunun nedeni, hastaların başka illerde enfekte olduktan sonra Konya, Aksaray ve Hatay'daki hastanelere başvurmuş olmaları ya da örneklem alanının hastaların yaşadığı bölgeden farklı bir alan olması olabilir.

Türkiye'nin pek çok ilinde henüz Hantavirüs açısından saha çalışması yapılmamıştır. Güncel durum bilgisine sahip olmadan ve olguların görülebileceği riskli bölgeler belirlenmeden, Hantavirüs enfeksiyonlarından korunmanın sağlanabilmesi olası değildir. Bu nedenle, henüz tarama yapılmamış alanlarda da saha çalışmaları planlanması önem taşımaktadır.

Teşekkür

Çalışmada serolojik taramalarda laboratuvar işlemlerine katkıda bulunan Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğrencisi Mert

Erdin'e teşekkürlerimizi sunarız. Bu çalışma, Tübitak 1001 Araştırma Destek Programı tarafından desteklenen SBAG214S276 numaralı proje kapsamında yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O.** Hantavirus infections Europe and their impact on public health. *Rev Med Virol* 2013; 23:35-49.
<https://doi.org/10.1002/rmv.1722>
2. **Jonsson CB, Figueriedo LT, Vapalahti O.** A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:412-41.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
3. **Kefelioglu H, Tez C, Gündüz İ.** The taxonomy and distribution of *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Mammalia: Rodentia) in the European Part of Turkey. *Türk J Zool* 2003; 27:141-6.
4. **Yiğit N, Çolak E, Sözen M, Karataş A.** Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Ankara: Meteksan Yayınevi, 2006.
5. **Krystufek B, Vohralik V.** Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: Rodentia) in Anatolia. *Zool Middle East* 2007; 42:25-36.
<https://doi.org/10.1080/09397140.2007.10638243>
6. **Krystufek B, Vohralik V.** Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. Slovenia: Koper, 2009.
7. **Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, et al.** Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *J Wildl Dis* 2006; 42:672-6.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.3.672>
8. **Ertek M, Buzgan T.** An outbreak caused by Hantavirus in the Black Sea Region of Turkey, January-May 2009. *Euro Surveill* 2009; 14:pii:19214.
9. **Celebi G, Piskin N, Öktem MA, ve ark.** Bir salgının anatomisi. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı; 25-29 Mart 2009; Antalya: Türkiye, 2009:163.
10. **Oktem IM, Uyar Y, Dincer E, et al.** Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:121-5.
<https://doi.org/10.3201/eid2001.121024>
11. **Polat C, Oktem MA, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacıoglu H.** Optimization of a commercial Hantavirus IgG enzyme immunoassay for human use to screen infection among wild rodents in Kırklareli, Turkey. "5th European Congress of Virology" Kongresi Kitabı; 11-14 Eylül 2013; Lyon: Fransa, 2013:193.
12. **Polat C, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacıoglu H, Öktem MA.** Yabani kemiricilerde Eski Dünya Hantavirüs IgG antikorlarının saptanması için ELISA ve immunoblot yöntemlerinin optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:245-55.
<https://doi.org/10.5578/mb.23161>

Hepatit C Virus Enfeksiyonlu Hastalarda Pegile İnterferon-Ribavirin Tedavisi Yanıtı ile Kemokin Ligand ve Reseptör Düzeyleri İlişkisi[§]

Orçun ZORBOZAN*, İlknur KALELİ*, Hüseyin TURGUT**

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

**Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

ÖZ

Amaç: Kronik hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar ciddi yan etkilere sahiptir. HCV-RNA tedavi yanıtını değerlendirmek için kullanılmaktadır. HCV genotipi tedavi süresi ve dozunun belirlenmesinde kullanılmaktadır, ancak henüz tedavi yanıtını öngörmek için bir belirteç bulunmamaktadır. Bu çalışma kemokinler, kemokin reseptörleri ve delta-32 delesyonu ile HCV enfeksiyonunda tedavi yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırmak için tasarlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 50 kronik HCV ile enfekte hasta ile 28 sağlıklı kontrol dâhil edilmiştir. Serum CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri ticari ELISA kiti ile ölçülmüştür. Periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonları akım sitometri tekniği ile gösterilmiştir. Delta-32 delesyonu real-time PCR ile araştırılmıştır.

Bulgular: Hastalar tedavi yanıtına göre iki gruba ayrılmıştır. CCR5+-CD8+ ve CXCR3+-CD8+ lenfositlerin yüzdesi her iki hasta grubunda da kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.021$), ancak hasta grupları arasında anlamlı fark yoktur ($p=0.872$). CCL4 ve CCL5 düzeyleri yanıtlı hastalar, yanıtız hastalar ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermemektedir. CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri ise hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. CCL3 ve CXCL9 düzeyleri yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında anlamlı fark göstermezken, CXCL10 düzeyi yanıtız hasta grubunda yanıtlı hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p=0.001$).

Sonuç: Bu çalışmanın bulgularına göre kronik HCV enfeksiyonunda periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonu artmıştır, ancak tedaviye yanıtı ve yanıtız hasta grupları arasında fark yoktur; serum CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri HCV enfeksiyonunda artmıştır ancak yalnızca CXCL10 tedavi yanıtı ile ilişkili bulunmuştur.

ABSTRACT

Relationship Between Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Response and Chemokine Ligand and Receptor Levels in Hepatitis C Virus Infected Patients

Objective: Antiviral agents used in chronic HCV infection treatment have serious side effects. HCV-RNA is used to evaluate treatment response. HCV genotype is used for determining duration and dose of treatment but there is no definite predictor of treatment response yet. This study is designed to investigate the relationship between chemokines, chemokine receptors, delta-32 deletion and HCV infection treatment response.

Material and Methods: Fifty chronic HCV-infected patients and 28 healthy controls were included in the study. Serum CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 and CXCL10 levels were measured by commercial ELISA kits. CCR5 and CXCR3 surface expressions of peripheral blood CD8+ cells were evaluated by flow-cytometry. Delta-32 deletions were evaluated by real-time PCR.

Results: Patients were divided into two groups according to their treatment responses. In both of the patient groups, percentages of CCR5+-CD8+ lymphocytes and CXCR3+-CD8+ lymphocytes were higher than those of the control ($p=0.001$, $p=0.021$, respectively); but there was no significant difference between patient groups ($p=0.872$). CCL3, CXCL9 and CXCL10 levels were significantly higher in patient groups than those of the control. CCL4 and CCL5 levels were not significantly different among responders, non-responders and control subjects. CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL9 levels were not significantly different between responder and non-responder patients, while CXCL10 levels in non-responders were higher than those of responders ($p=0.001$).

Conclusion: According to the findings of this study, CCR5 and CXCR3 surface expressions of CD8+ cells in the peripheral blood increased in chronic hepatitis C but there was no difference between responder and non-responder patient groups; CCL3, CXCL9 and CXCL10 levels increased in HCV infection, however, only CXCL10 predicted the treatment response.

Anahtar kelimeler: Delta 32, kemokinler, konak-virus ilişkileri

Keywords: Delta 32, chemokines, host-virus interactions

Alındığı tarih: 07.02.2017

Kabul tarihi: 24.03.2017

Yazışma adresi: Orçun Zorbozan, Ege Üniversitesi Hastanesi, Poliklinikler Binası Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova 35080 İzmir

e-posta: orcun-zorbozan@hotmail.com

Tel: (0232) 390 49 16

[§] Bu çalışma 24. ECCMID Kongresi'nde (10-13 Mayıs 2014, Barselona, İspanya) poster bildirisi (P1939) olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Mevcut birçok yayın, inflame karaciğere lökosit dolaşımında kemokinleri ve kemokin reseptörlerini kilit rol alan oyuncular olarak göstermektedir. Ayrıca kemokinler inflamasyonun devamlılığı ile sağlanan karaciğer rejenerasyonu, fibrozis ve malign transformasyonla da ilişkili olabilirler⁽¹⁻⁵⁾. HCV'ye özgü T hücrelerin enfeksiyonu kontrol altına alması için, kemokinler ve kemokin reseptörleri arasındaki ilişki esansiyeldir. Kazanılmış immün yanıt bu görevi yerine getiremezse, enfeksiyonu kontrol etme kapasitesine sahip olmayan non-spesifik T hücreler de karaciğere göç ederek kalıcı karaciğer hasarına yol açarlar. Kemokin reseptör ekspresyonunun ve kemokin salgılanmasının düzenlenmesi, enfeksiyonun erken fazında özgün T hücre göçünü engelleyerek, kronik fazında ise non-spesifik T hücre göçünü bozarak karaciğer canlılığını sağlamak suretiyle, viral kaçış mekanizması olabilir. Bazı kemokinler ve reseptörleri karaciğer hasarı ile korelasyon göstermektedir, CXCL10 ve CXCR3 düzeyleri tedaviye yanıt tahmin etmede yarar sağlamışlardır⁽⁶⁾. Virusun kendisinin yaptığı tahribatın yanı sıra kronik HCV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar da ciddi yan etkilere sahiptir. HCV enfeksiyonunda güncel tedavi yaklaşımında pegile interferon-ribavirin tedavisi yerine direkt etkili ajanlar (DEA) tercih edilmeye başlanmıştır. DEA; NS3/4A proteaz inhibitörleri, NS5A inhibitörleri ve NS5B polimeraz inhibitörlerini içerir. NS3/4A proteaz inhibitörleri birinci nesil DEA sınıfındadırlar ve HCV replikasyonu için gerekli olan poliprotein işlenmesini engeller. Bugüne kadar mevcut olan ilaçlar beseprevir, telaprevir, simeprevir, asunaprevir ve paritaprevirdir. Daclatasvir, ledipasvir veya ombitasvir gibi NS5A inhibitörleri, çeşitli HCV genotiplerini etkiler ve diğer DEA sınıfları ile kombinasyon hâlinde sinerjik bir etki gösterirler⁽⁷⁾. HCV genotipi tedavi süresinin ve dozunun belirlenmesinde kullanılmaktadır, ancak henüz teda-

vi yanıtını öngördüren bir belirteç kullanımda değildir. Bu çalışmada, kemokinler, kemokin reseptörleri ve delta-32 delesyonu ile HCV enfeksiyonunda tedavi yanıtı arasındaki ilişki araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Grupları

Mart 2012-Ekim 2012 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran 56 kronik HCV enfeksiyonlu hasta ve 28 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Kronik hastalık (diyabet, hipertansiyon), alerjik hastalık, HCV enfeksiyonu dışındaki karaciğer hastalıkları varlığı ile kriyoglobulinemi ve tirodit varlığı dışlama kriteri olarak kullanıldı. Altı hasta tedavinin kesilmesi nedeniyle çalışma dışında bırakıldı. Tüm hastalarda uygulanan tedavi standart pegile interferon ve ribavirin kombinasyonu şeklindeydi. Alanin-aminotransferaz (ALT) ölçümleri Cobas 8000 Otoanalizörü c501 modülü (Roche Diagnostics, ABD) ile yapıldı. HCV viral yük ölçümleri Cobas AmpliPrep/ Cobas TaqMan HCV Quantitative Test (Roche Diagnostics, ABD) kullanılarak yapıldı. Tüm katılımcılardan aydınlatılmış onam alındı.

Örneklerin Toplanması

Çalışmaya alınan tüm katılımcılardan bir adet vakumlu jelli tüpe ve 1 adet EDTA'lı tüpe venöz kan alındı. Vakumlu jelli tüpe alınan kandan elde edilen serumdan ELISA çalışmalarında kullanılmak üzere 500 µL ayrılarak -20°C'de saklandı. EDTA'lı tüpteki tam kanın 200 µL'si akım sitometri çalışmaları için hemen kullanıldı, kalan tam kan ise PCR analizi için -20°C'de saklandı.

Kemokin Ligand Düzeylerinin Ölçülmesi

CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 (Invitrogen,

ABD) ve CXCL9 (Raybiotech, ABD) düzeylerinin ölçümü ticari ELISA kitleri kullanılarak yapıldı. Analiz basamakları üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm kuyucukların absorbansı ELx808 ELISA okuyucusunda (BioTek Instruments, ABD) 450 nm dalga boyunda kaydedildi. Standart eğriler Gen5 Veri Analiz Yazılımı (BioTek Instruments, ABD) ile oluşturuldu.

Kemokin Reseptör Düzeylerinin Ölçülmesi

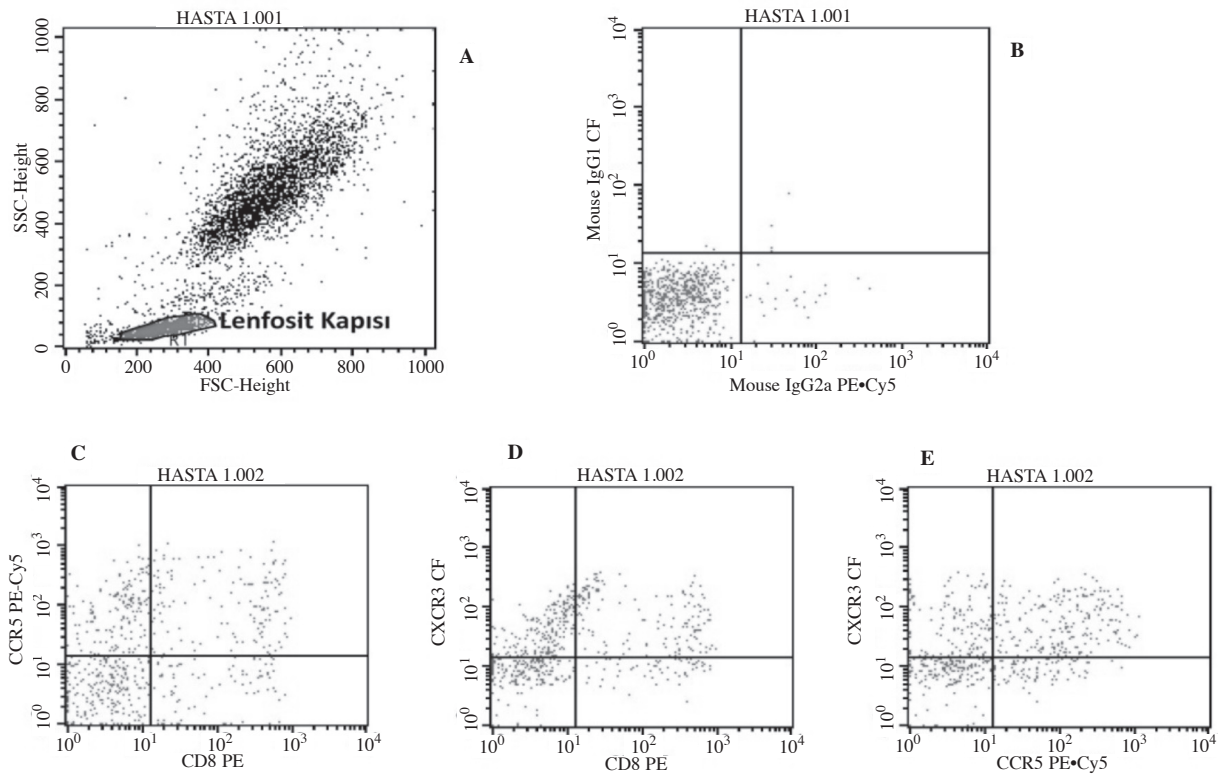
Periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonları akım sitometri ile üretici firma önerilerine uygun olarak gerçekleştirildi. CCR5-Cy5 (BD Pharmingen), CXCR3-CF (LifeSpan BioSciences), CD8-PE (Imgenex) monoklonal antikorları ve fare PE-Cy5 IgG2a, fare CF IgG1 izotip kontrolleri kullanıldı.

Hücrelerin inkübasyonu ve yıkaması üretici

firma önerilerine göre yapıldı. İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra hücreler FACSCalibur (Becton-Dickinson, ABD) cihazında akım sitometri işlemine tabi tutuldu. Her tüp için 10000 olay kaydedildi ve Cell Quest Pro yazılımı ile analiz edildi. Kaydedilen olaylar forward scatter/side scatter, IgG2a-PE-Cy5/IgG1-CF, CD8-PE/CCR5-PE-Cy5 ve CD8-PE/CXCR3-CF diagramlarında analiz edildi. “Forward scatter/side scatter” diagramında lenfosit kapısı alındı. Seçilen lenfositler ile izotip kontrol diagramında kadrantlar belirlendi. CD8+ hücrelerin kemokin reseptör düzeyleri CD8-PE/CCR5-PE-Cy5 ve CD8-PE/CXCR3-CF diagramlarında sağ üst kadrantdaki hücrelerin yüzdesi olarak belirlendi (Şekil 1).

CCR5 Delta-32 Delesyonunun Tespiti

CCR5 delta-32 delesyonunun tespiti real-time PCR ile yapıldı. Genomik DNA Roche® High



Şekil 1. Akım sitometri analiz grafikleri A. “Forward Scatter-Side Scatter” grafiği, B. İzotip kontroller, C. CD8-CCR5 grafiği, D. CD8-CXCR3 grafiği.

Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak tam kandan elde edildi. DNA ekstraksiyonu üretici firma önerilerine göre yapıldı. PCR sırasında ABD Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI: National Center for Biotechnology Information) veritabanında yer alan insana ait NM000579.3 numaralı “chemokine (C-C motif) receptor 5” geni hedeflendi. D32-F(5′-ACCTGCAGCTCT-CATTTTCC-3′) ve D32-R(5′-CCAGCCCCA-AGATGACTATC-3′) DNA primerleri ile LightCycler™ sistemi ve “LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I” kullanıldı.

İşlem amplifikasyon ve melting curve analizini içeren iki aşama şeklinde gerçekleştirildi. 95°C’de 10 dakika ön inkübasyonu takiben 45 döngü amplifikasyon yapıldı (95°C’de 10 sn., 60°C’de 10 sn. ve 72°C’de 10 sn.). Altmışbeş °C’den 95°C’ye 0.1°C/sn. eğimle “melting curve” elde edilirken oluşan floresans 530 nm dalga boyunda ölçüldü. 32 baz çiftlik delesyonu içeren amplikon, delesyon içermeyen amplikona göre 2°C daha düşük erime sıcaklığına sahipti.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 16.0 (Chicago, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm SD$), normal dağılım göstermeyen veriler ise ortanca ve çeyreklikler arası fark (m; IQR) olarak belirtildi. Çalışmadaki değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi.

Değişkenlerin tedavi yanıtı üzerindeki etkisini değerlendirmek için çok değişkenli lojistik regresyon analizi uygulandı. Normal dağılıma uyan ölçümsel değişkenlerin gruplar arasındaki farkı tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile değerlendirildi. Normal dağılıma uymayan ölçümsel değişkenlerin gruplar arasındaki farkı Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Belirlenen farkın hangi gruplar arasında

olduğunu saptamak için parametrik koşulları sağlayan verilere post-hoc testlerden (çoklu karşılaştırma testleri) Tukey testi, karşılamayan verilere de Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi uygulandı. Ölçümsel olmayan değişkenler için ki-kare testi kullanıldı.

Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testinde anlamlılık sınırı $p < 0.05/3$ (0.016 olarak) kabul edildi. Diğer tüm istatistiksel analizler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Bu araştırma için Pamukkale Üniversitesi Etik Kurulu onayı alınmıştır (02.11.2010/07).

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 2011TPF033).

BULGULAR

Çalışmaya 28 kadın ve 22 erkek olmak üzere toplam 50 hasta dâhil edildi. Kan örnekleri yedi hastada tedavinin başlandığı gün, 43 hastada tedavi başladıktan sonraki iki hafta içerisinde alındı. Hastalar tedavi yanıtına göre iki gruba ayrıldı. Tedavi yanıtının değerlendirilmesi tedavi sırasında ve sonrasındaki HCV viral yüküne göre yapıldı. Yanıtlı grup 19’u kadın ve 14’ü erkek olmak üzere 33 hastadan oluşuyordu. Yanıtlı hastaların 26’sında kalıcı virolojik yanıt (sustained virological response; SVR), dördünde erken virolojik yanıt (early virological response; EVR), birinde kısmi EVR ve ikisinde tedavi sonu yanıtı (end of treatment response; ETR) elde edildi. Yanıtsız hasta grubu ise dokuz kadın ve sekiz erkek olmak üzere 17 hastadan oluşuyordu. Yanıtsız hastaların 11’inde hiç yanıt görülmezken, altısında relaps izlendi. Kontrol grubu ise 16 kadın ve 12 erkek olmak üzere 28 kişiden oluşuyordu. Yanıtsız hastaların %52.9’u, yanıtlı hastaların ise %57.6’sı kadın hastalardı (Tablo 1). Kadın hastaların %32.1’i ve erkek hastaların %57.1’i yanıtsızdı.

Tablo 1. Hasta grupları ve kontrol grubunun demografik özellikleri ile ALT, HCV-RNA, kemokin ve kemokin reseptör düzeyleri.

	Yanıtlı hastalar n=33	Yanıtız hastalar n=17	Kontrol grubu n=28
Yaş ($\bar{x}\pm SD$ yıl)	47.7 $\pm$ 9.9	50.2 $\pm$ 9.58	52 $\pm$ 12.3
Erkek (%)	42.4	47.1	42.9
Kadın (%)	57.6	52.9	57.1
ALT (m (IQR) U/L)	17 (12.9)	35 (63.5)	6 (1.9)
HCV-RNA (m (IQR) kopya/ml)	3.9x101 (12.7x101)	1.03x106 (4.08x106)	-
CCR5+-CD8+ (%)	15.59	16.01	11.36
CXCR3+-CD8+ (%)	23.20	22.14	16.15
CCL3 ($\bar{x}\pm SD$ pg/ml)	3.64 $\pm$ 4.73	5.09 $\pm$ 3.45	0.94 $\pm$ 1.10
CCL4 ($\bar{x}\pm SD$ pg/ml)	59.87 $\pm$ 20.52	63.75 $\pm$ 20.50	48.94 $\pm$ 20.15
CCL5 ($\bar{x}\pm SD$ ng/ml)	59.53 $\pm$ 81.38	40.94 $\pm$ 17.29	29.78 $\pm$ 12.61
CXCL9 ($\bar{x}\pm SD$ ng/ml)	2.07 $\pm$ 2.57	2.55 $\pm$ 2.44	0.63 $\pm$ 0.30
CXCL10 (m (IQR) pg/ml)	169.75 (132.47)	398.04 (302.49)	92.24 (61.76)

$\bar{x}\pm SD$: Ortalama $\pm$ standart sapma, m: Medyan, IQR: Çeyreklikler arası fark..

Hasta gruplarından HCV genotipi ile ilgili verilerine ulaşılan 31 hastadan 29 hastanın HCV genotipi tip 1b, bir hastanın HCV genotipi tip 2b, bir hastanın HCV genotipi tip 3a olarak tespit edildi. Genotip 1b baskınlığı nedeniyle farklı genotiplere göre istatistiksel analiz gerçekleştirilemedi.

Tedavi rejimi 34 hastada tek başına pegile interferon, 16 hastada pegile interferon-ribavirin kombinasyonu şeklindeydi. Farklı tedavi rejimlerine göre tedavi yanıtlarında anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.101).

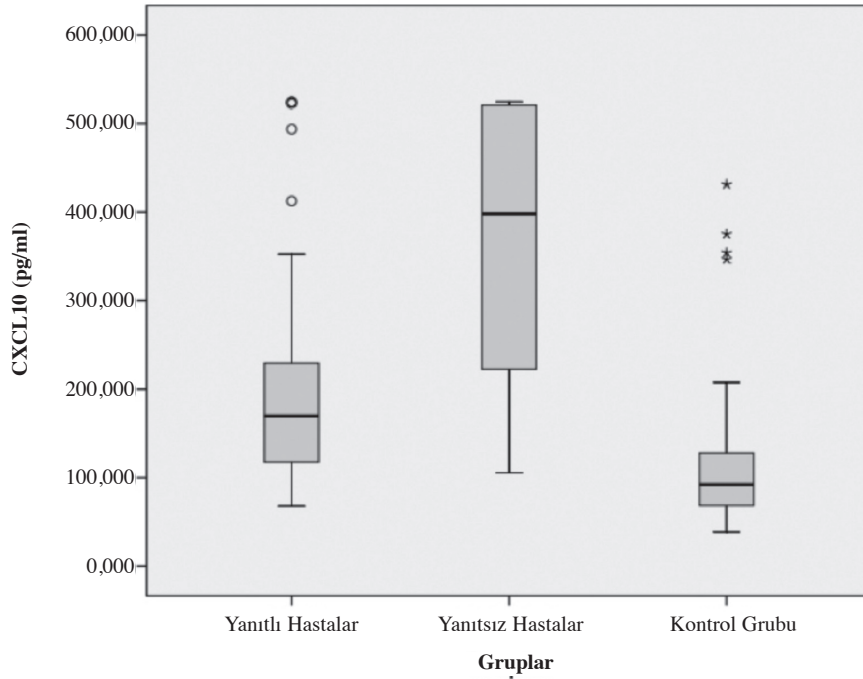
Kolmogorov-Smirnov testine göre normal dağılım göstermeyen ALT, HCV-RNA ve CXCL10 düzeyleri m; IQR biçiminde belirtilirken, diğer tüm veriler $\bar{x}\pm SD$ biçiminde belirtildi (Tablo 1).

Hasta ve kontrol grupları arasında yaş (p=0.335) ve cinsiyet (p=0.948) açısından anlamlı fark yoktu (Tablo 1).

Yanıtlı hastalarda ve yanıtız hastalarda CCR5+-CD8+ lenfositlerin yüzdesi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.022 ve p=0.039) ancak yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.971) (Tablo 1). Benzer şekilde yanıtlı hastalarda ve yanıtız hastalarda CXCR3+-CD8+ lenfositlerin yüzdesi

kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.001 ve p=0.021), ancak yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.872) (Tablo 1).

Serum CCL3 düzeyleri yanıtlı ve yanıtız hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.011 ve p=0.001), ancak yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.358) (Tablo 1). Serum CCL4 düzeyleri açısından hem yanıtlı ve yanıtız hasta grupları ile kontrol grubu arasında (sırasıyla p=0.099 ve p=0.053) hem de yanıtlı ve yanıtız hasta grupları arasında (p=0.800) anlamlı fark yoktu (Tablo 1). Benzer şekilde serum CCL5 düzeyleri açısından hem yanıtlı ve yanıtız hasta grupları ile kontrol grubu arasında (sırasıyla p=0.090 ve p=0.782) hem de yanıtlı ve yanıtız hasta grupları arasında (p=0.489) anlamlı fark yoktu (Tablo 1). Serum CXCL9 düzeyleri yanıtlı ve yanıtız hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.020 ve p=0.008), ancak yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.713) (Tablo 1). Serum CXCL10 düzeyleri yanıtlı ve yanıtız hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.001 ve p=0.001). Serum CXCL10 düzeyleri yanıtız hastalarda yanıtlı hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.001) (Tablo 1) (Şekil 2).



Şekil 2. Hasta grupları ve kontrol grubunda serum CXCL10 düzeylerini gösteren grafik.

Hastalar tedavi rejimine göre gruplandırıldığında tekli tedavi grubunda yanıtli ve yanıtsız hastalar arasında CXCL10 düzeyleri açısından anlamlı fark yok iken ($p=0.995$), kombinasyon tedavisi alan yanıtsız hastalarda yanıtli hastalara CXCL10 düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ($p=0.001$).

Korelasyon analizlerinde CCL3 ($r=0.257$), CCL4 ($r=0.316$) ve CXCL10 ($r=0.551$) ALT ile anlamlı korelasyon gösterirken (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.004$ ve $p=0.001$) yalnızca CXCL10 ($r=0.652$) HCV-RNA ile anlamlı korelasyon gösterdi ($p=0.001$).

CCR5 delta-32 delesyonunun saptanması için yapılan real time PCR sonucunda tüm hasta ve kontrol örnekleri “wild type” olarak tespit edildi, delesyon saptanmadı.

TARTIŞMA

HCV enfeksiyonunun akut döneminde spontan

eradikasyonun sağlanması için çeşitli viral epitoplara karşı güçlü bir CD4 ve CD8 yanıtı gerekmektedir. Virüse özgü immün yanıtı geliştiremeyen veya yanıtı zamanla azalan olgular kronikleşmektedirler. Akut HCV enfeksiyonu ile ilgili çalışmaları insanlarda yapmanın çeşitli zorluklara sahip olması ve HCV enfeksiyonu sürecini tam olarak ortaya koyabilen güvenilir hayvan modellerinin kısıtlı olması nedeni ile HCV enfeksiyonunda oluşan inflamasyon ve rol alan kemokinler ile ilgili veriler kronik enfeksiyon fazına dayandırılmaktadırlar⁽⁸⁾. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer lezyonlarının oluşmasına ve ilerlemesine neden olan mekanizma ya da mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, HCV viral yükü ile karaciğer hastalığının ciddiyeti ve prognozu arasında ilişki bulunmaması HCV’nin sitopatik olmadığını düşündürmektedir. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer hasarının bileşenleri portal lenfoid infiltrasyon, fokal ve köprüleşme nekrozları ile dejeneratif lobüler lezyonlardır. Bu lezyonlar adezyon molekülleri ve kemokinler aracılığı ile

karaciğerde toplanan T hücreleri tarafından oluşturulan bölgesel immün yanıtı bağli olarak meydana gelmektedirler. Oluşan lenfoid infiltrat esas olarak periportal aralıkta bulunan CD4+ tip 1 yardımcı T hücreler ile hem periportal hem de lobüler alanlarda yer alan CD8+ T hücreleri içermektedir. Karaciğerde oluşan lezyonların ciddiyeti tip 1 yardımcı T hücreler ile ilişkili sitokinlerin bölgesel ekspresyonu ile ilişkilidir⁽⁹⁾.

Uzamış HCV enfeksiyonunda karaciğerde esas olarak CD8+ T hücrelerden oluşan ve özgün olmayan inflamatuvar infiltrat bulunmaktadır. Bu hücreler, karaciğerde salgılanan kemokinler ve T hücreleri üzerindeki kemokin reseptörleri arasındaki etkileşim sonucunda karaciğere gelmektedirler⁽⁶⁾. Hepatositlerde HCV replikasyonunun devam etmesi kemokin üretimine yol açarak inflamatuvar hücrelerin sürekli olarak karaciğerde toplanmasını sağlamaktadır. Toplanan bu inflamatuvar hücreler de kemokin ve sitokin üretimine yol açarak sürekli bir inflamatuvar döngü oluşturmaktadırlar⁽⁸⁾. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere baskın olarak Th1 ve Tc1 tipindeki lenfositler göç etmektedirler. Bu tipteki lenfositler yüzeylerinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerini yüksek miktarlarda eksprese etmektedirler. Karaciğerde salgılanan ELR-”CXC kemokinler CXCR3 eksprese eden lenfositleri karaciğere yönlendirmekte, CC kemokinler ise CCR5 eksprese eden lenfositleri karaciğere yönlendirmektedirler. Kronik HCV enfeksiyonunda hepatik lobülde ve portal bölgelerde CCR5 ve CXCR3 eksprese eden T lenfositler yoğun olarak bulunmaktadır⁽⁶⁾.

Standart pegile interferon ve ribavirin tedavisi ile kronik HCV enfeksiyonlu hastaların ancak %55’inde SVR elde edilmektedir. Tedavi başarısızlığına virüse ait faktörler ve konak faktörleri birlikte etki etmektedirler⁽¹⁰⁾. İnflamasyondaki rolünün yanı sıra bazı kemokinlerin ve reseptörlerinin antiviral tedavi yanıtının iyi bir göstergesi de olan bir konak faktörü olabileceğine vurgu

yapan çalışmalar bulunmaktadır⁽⁸⁾. Sunulan araştırmada da, HCV ile enfekte hastalarda kemokin reseptörleri, bu reseptörlerle ilişkili kemokinler ve CCR5 delta-32 delesyonu ile HCV enfeksiyonunun tedavi yanıtı arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Sunulan araştırmada, hem yanıtli hasta grubunda hem de yanıtızsız hasta grubunda CCR5+-CD8+ lenfositlerin ve CXCR3+-CD8+ lenfositlerin yüzde oranları kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. HCV enfeksiyonunun akut evresinde yoğun bir şekilde HCV’ye spesifik sitotoksik T lenfosit yanıtı görülürken vireminin kontrol altına alınması ile birlikte bu yanıt azalmaktadır, ancak viral kontrolün sağlanamaması durumunda kayda değer sitotoksik T lenfosit yanıtının devam ettiği bildirilmektedir⁽⁵⁾. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere Th1 ve Tc1 tipindeki lenfositler baskın olarak göç etmektedirler ve bu tipteki lenfositler yüzeylerinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerini yoğun olarak eksprese etmektedirler⁽⁶⁾. Bu nedenlere bağli olarak sunulan araştırmadaki hasta grubunda da periferik kanda CD8+ lenfositlerin CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptör ekspresyonlarının yoğun olmasını beklemekteydik. Perney ve ark.⁽¹¹⁾ da periferik kanda CD4+ T hücrelerde CCR5 ve CXCR3 ekspresyonunu hasta grubunda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Larrubia ve ark.’nın⁽¹²⁾ yaptığı çalışma ise, çalışmamızın sonuçları ile çelişmektedir. Larrubia ve ark.’nın⁽¹²⁾ çalışmasında, hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında periferik kandaki CD8+ T hücrelerinde CCR5 ve CXCR3 reseptör ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmamıştır, esas ekspresyon artışı karaciğeri infiltre eden lenfositlerde görülmüştür. Oluşan bu farklılık teknik nedenlere bağli olabilir; kemokin reseptörlerinin ekspresyonu in-vitro olarak hızla düşmektedir, bu nedenle kanın alınmasından akım sitometri işlemine kadar geçen süre reseptör ekspresyonunun belirlenmesinde önemlidir.

Yine sunulan araştırmada yanıtli hasta grubu ve yanıtli hasta grubu arasında CCR5+-CD8+ lenfositlerin ve CXCR3+-CD8+ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı. Literatürde sunulan araştırmada olduğu şekilde HCV enfeksiyonlarında tedavi yanıt gruplarına göre hem CCR5 hem de CXCR3 ekspresyonlarını birlikte aynı hasta grubunda araştıran çalışmaya rastlanmamıştır.

Kemokin reseptörlerinin yanı sıra kemokin ligandlarının da HCV enfeksiyonlarının patojenezindeki ve tedavi yanıtındaki rolü araştırılmaktadır. Sunulan araştırmada, hasta gruplarında serum CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunurken, serum CCL4 ve CCL5 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. CCR5 ile ilişkili kemokin ligandları açısından bakıldığında çalışmamızın sonuçları Florholmen ve ark.'nın⁽¹³⁾ çalışmasıyla CCL3, CCL4 ve CCL5 için uyumlu iken, Zeremski ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ çalışmasıyla CCL3 açısından çelişmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre CCL3 düzeylerinin ve beraberinde reseptörü CCR5'in ekspresyonunun hasta gruplarında anlamlı olarak yüksek olduğu göz önünde bulundurulduğunda, CCL3'ün HCV enfeksiyonlarının patojenezinde rolü olduğu düşünülebilir. CXCR3 ile ilişkili kemokin ligandları açısından bakıldığında Apolinario ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ çalışmasında olduğu gibi, sunulan çalışmada da CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri hasta gruplarında kontrole göre yüksektir. Sunulan araştırmaya benzer şekilde Zeremski ve ark.'nın⁽¹⁶⁾ da CXCR3 ile ilişkili kemokinlerin hepatik ekspresyonlarını HCV enfeksiyonu bulunan hastalarda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Sunulan araştırma CXCR3 ile ilişkili ligandlar olan CXCL9 ve CXCL10 kemokinlerinin HCV enfeksiyonundaki rolünü desteklemektedir.

Sunulan çalışmada serum CCL3, CXCL9 ve CXCL 10 düzeyleri hasta grupları arasında kar-

şılaştırıldığında CCL3 ve CXCL9 için yanıtli ve yanıtli hastalar arasında fark bulunmazken, serum CXCL10 düzeyleri yanıtli hasta grubunda yanıtli hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. CCL3 için bu araştırmada elde edilen sonuçlar Florholmen ve ark.'nın⁽¹³⁾ yaptığı çalışma ile uyumludur. CXCL10 için bu araştırmanın sonuçları Apolinario ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ çalışması ile benzerdir. Apolinario ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ yanıtli hastalarda bazal CXCL10 düzeyini yanıtli hastalara göre yüksek bulmuşlardır ve tedavi sonrasında yanıtli hastalarda düzeyler anlamlı olarak düşmüştür. Sunulan çalışmada ise ağırlıklı olarak tedavi sırasındaki düzeyler ölçülerek yanıtli hastalarda yanıtli hastalara göre CXCL10 düzeyleri yüksek bulunmuştur. Sunulan çalışmada bulduğumuz CXCL10 düzeyleri ve tedavi yanıtı arasındaki ilişki benzer şekilde Lagging ve ark.'nın⁽¹⁷⁾, Romero ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ ve Fattovich ve ark.'nın⁽¹⁹⁾ yaptıkları çalışmalarda da vardır.

Sunulan çalışmada, HCV genotipi ile ilgili verisi bulunan 31 hastadan 29 hastanın HCV genotipi tip 1b, 1 hastanın HCV genotipi tip 2b, 1 hastanın HCV genotipi tip 3a olarak tespit edilmiştir. Tip 1b ile enfekte 29 hastanın 10'unda tedaviye yanıt alınamazken, 3 hastada EVR, 1 hastada kısmi EVR, 2 hastada ETR, 13 hastada SVR, tip 2b ile enfekte 1 hastada SVR, tip 3a ile enfekte 1 hastada ise EVR elde edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde, Türkiye'nin batı bölgelerinde yapılan çalışmalarda, HCV genotip 1b %90'ın üzerinde tespit edilmiştir⁽²⁰⁻²²⁾.

Sunulan çalışmada, CCR5 delta-32 delesyonunun saptanması için yapılan real-time PCR sonucunda tüm hasta ve kontrol örnekleri "wild type" olarak tespit edildiği için tedavi yanıtı ile CCR5 delta-32 delesyon varlığı arasındaki ilişki incelenememiştir.

Bu çalışmanın bulgularına göre kronik HCV enfeksiyonunda periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonu artmıştır

ancak tedaviye yanıtı ve yanıtı olmayan hasta grupları arasında fark yoktur. Serum CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri HCV enfeksiyonunda artmıştır, ancak yalnızca CXCL10 düzeyleri pegile interferon-ribavirin kombinasyon tedavisi alan yanıtı olmayan hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. CXCL10 düzeylerinin ölçümü pegile interferon-ribavirin kombinasyon tedavisi alan kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda tedavi yanıtını tahmin etmede kullanılabilir. CXCL10 düzeyleri ölçümü ELISA yöntemi ile yapıldığı için hem göreceli olarak hızlı ve ucuzdur, hem de otomatize sistemlere uyarlanması kolaydır.

Bu çalışmanın iki temel kısıtlılığı bulunmaktadır. Birincisi, kan örneklerinin tümü tedavinin başladığı gün alınmamıştır. İkincisi, bu çalışmadan elde edilen veriler tüm HCV genotipleri ve farklı tedavi rejimleri için genelleştirilemez. CXCL10 düzeylerinin tedavi yanıtını tahmin etmedeki rolünün tam olarak ortaya konabilmesi için farklı HCV genotiplerini ve farklı tedavi rejimlerini içeren hasta gruplarında araştırmaların yapılmasına gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 2007; 39:50-62. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.05.013>
2. Ahlenstiel G, Berg T, Woitas RP, et al. Effects of the CCR5-Δ32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 39:245-52. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00193-4)
3. Curbishley SM, Eksteen B, Gladue RP, Lalor P, Adams DH. CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *Am J Pathol* 2005; 167:887-99. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62060-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62060-3)
4. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163:6236-43.
5. Willberg C, Barnes E, Klennerman P. HCV immunology-death and the maiden T cell. *Cell Death Differ* 2003; 10(Suppl 1):S39-47. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401122>
6. Larrubia JR, Benito-Martínez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14:7149-59. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.7149>
7. Korean Association for the Study of the Liver (KASL). KASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C. *Clin Mol Hepatol* 2016; 22:76-139. <https://doi.org/10.3350/cmh.2016.22.1.76>
8. Zeremski M, Petrovic LM, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007; 14:675-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00838.x>
9. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; 12:96-102. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.12.005>
10. Tai AW, Chung RT. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 2009; 50:412-20. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.11.010>
11. Perney P, Turriere C, Portalès P, et al. CXCR3 expression on peripheral CD4+ T cells as a predictive marker of response to treatment in chronic hepatitis C. *Clin Immunol* 2009; 132:55-62. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.03.521>
12. Larrubia JR, Calvino M, Benito S, et al. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2007; 47:632-41. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.009>
13. Florholmen J, Kristiansen MG, Steigen SE, et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1α, MIP-1β and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:204-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03206.x>
14. Zeremski M, Hooker G, Shu MA, et al. Induction of CXCR3- and CCR5-associated chemokines during acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55:545-53. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.033>
15. Apolinario A, Diago M, Lo Lacono O, et al. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19:551-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01872.x>
16. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48:1440-50. <https://doi.org/10.1002/hep.22500>
17. Lagging M, Romero AI, Westin J, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006; 44:1617-25. <https://doi.org/10.1002/hep.21407>
18. Romero AI, Lagging M, Westin J, et al. Interferon (IFN)-γ-inducible protein-10: association with

histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN- α 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006; 194:895-903.

<https://doi.org/10.1086/507307>

- 19. Fattovich G, Covolo L, Bibert S, et al.** IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33:1162-72.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04635.x>
- 20. Altuglu I, Soyler I, Ozacar T, Erensoy S.** Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis*

2008; 12:239-44.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.07.003>

- 21. Kabakçı Alagoz G, Karataylı SC, Karataylı E, et al.** Hepatitis C virus genotype distribution in Turkey remains unchanged after a decade: performance of phylogenetic analysis of the NS5B, E1, and 5'UTR regions in genotyping efficiency. *Turk J Gastroenterol* 2014; 25:405-10.
<https://doi.org/10.5152/tjg.2014.7083>
- 22. Sunbul M, Khan A, Kurbanov F, et al.** Tracing the spread of hepatitis c virus in Turkey: A phylogenetic analysis. *Intervirology* 2013; 56:201-5.
<https://doi.org/10.1159/000346775>

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii* ve *Escherichia coli* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçlarının EUCAST ve CLSI'ya Göre Yorumlanması: Hacettepe Deneyimi[§]

Salih MAÇIN*, Yakut AKYÖN YILMAZ**, Özben ÖZDEN**, Deniz GÜR**

*Şırnak Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şırnak

**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÖZ

Amaç: Antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) akılcı antibiyotik kullanımı için önemli bir katkı sağlamaktadır. Bu testlerin uygulanmasında, iki standart rehber tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde son yıllara kadar CLSI Standartları kullanılmakta iken, artık EUCAST standartlarına geçiş süreci başlamıştır. Yeni standartlara geçilmesiyle birlikte, güncel epidemiyolojik verilerin eskileriyle karşılaştırılmasında hangi antibiyotiklere dikkat edilmesi gerektiği ortaya konmalıdır. Bu çalışmanın amacı, CLSI ve EUCAST rehberlerindeki sınır değeri değişikliklerinin ADT raporlarındaki etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 1 Ocak 2012 ve 31 Aralık 2013 arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen ve ADT'leri CLSI ile yorumlanmış olan toplam 1650 izolatın direnç oranları EUCAST standartlarına göre yeniden değerlendirilmiştir.

Bulgular: CLSI ve EUCAST standartları ile alınan sonuçlar karşılaştırıldığında direnç yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur. Bununla birlikte, en büyük fark *Pseudomonas aeruginosa*'da levofloksasin için %9.7 olarak saptanmıştır. Ayrıca *P. aeruginosa* için siprofloksasinde %7 fark saptanmıştır. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında amikasinde (%2.8) ve levofloksasinde (%1.7) az oranda fark bulunmuştur. *Escherichia coli* izolatları için de siprofloksasin (%1.2), amoksisilin/klavulanat (%2.5), sefepim (%1.6) ve seftazidimde (%4.2) az oranda farklılıklar bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışmada, ülkemizde EUCAST standartlarına geçiş sürecinde CLSI ile yorumlanmış olan sonuçlar EUCAST rehberlerinde önerilen direnç sınır değerlerine göre yine yorumlanmış ve farklar ortaya konmuştur. EUCAST standartları uygulanırken bu farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, antibiyotikler, CLSI, *Escherichia coli*, EUCAST, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Interpretation of Antibiotic Susceptibility Test Results of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* Isolates According to EUCAST and CLSI: Hacettepe Experience

Objective: Antibiotic susceptibility tests (AST) provide an important contribution to the rational use of antibiotics. Two standard guidelines are commonly used for the application of test results worldwide. In our country CLSI guidelines have been used up to recent years, but currently a transition to implementation of EUCAST standards has begun. With the adoption of the new standards, the current epidemiological data should be compared with the previous data so as to reveal the antibiotics which should be paid attention. The aim of this study was to analyse the effects of changes in clinical cut-off values in CLSI and EUCAST guidelines on AST reports.

Material and Methods: A total of 1650 antimicrobial test results which were reported according to CLSI standards in Hacettepe University Clinical Microbiological Laboratory from 1 January 2012 to 31 December 2013 were included in the study.

Results: Resistance rates were found to be nearly similar according to CLSI and EUCAST standards. Highest difference was found in *Pseudomonas aeruginosa* and levofloxacin (9.7%); also there were differences in ciprofloxacin (7%) for *P. aeruginosa*. In *Acinetobacter baumannii* there were minor differences in amikacin (2.8%) and levofloxacin (1.7%). In *Escherichia coli*, ciprofloxacin (1.2%), amoxicillin-clavulanate (2.5%), cefepime (1.6%) and ceftazidime (4.2%) differed slightly in EUCAST.

Conclusion: In our country, CLSI guidelines are being replaced by EUCAST guidelines. In this study, antimicrobial susceptibility results interpreted by CLSI guidelines were reinterpreted according to EUCAST cut-off values and changes in the susceptibility categories were assessed. These differences should be taken into account when EUCAST standards are employed.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Antibiotics, CLSI, *Escherichia coli*, EUCAST, *Pseudomonas aeruginosa*

Alındığı tarih: 03.10.2016

Kabul tarihi: 23.03.2017

Yazışma adresi: Salih Maçın, Şırnak Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şırnak

e-posta: salihmacin@hotmail.com

[§] Bu araştırma 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde 2015 (18-22 Kasım 2015, Antalya) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) rutinde tedaviye yol göstermesinin ve akılcı antibiyotik kullanımı için katkı sağlamasının yanında epidemiyolojik veri sağlaması açısından da büyük bir önem taşımaktadır. Bu testlerin uygulanmasında, iki standart tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde son yıllara kadar “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) Standartları kullanılmakta iken, artık “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) standartlarına geçiş kararı alınmıştır. Otomatize sistemlerde sonuçlar artık EUCAST sınır değerlerine göre yorumlanmaktadır^(1,2). Bununla birlikte, bazı CLSI sınır değerlerinin EUCAST sınır değerlerinden farklı olduğu göz önüne alındığında, güncel epidemiyolojik verilerin eskileriyle karşılaştırılmasında hangi antibiyotiklerde değişiklik bekleneceği bilinmeli, antibiyotiklere direnç artışı izlenirken bu konu göz önünde tutulmalıdır. Doğru antibiyotik kullanımının direnç artışını azaltacağı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır⁽³⁾. Ülkemizin EUCAST standartlarına geçtiği bu dönemde iki rehber arasındaki direnç oranlarındaki farklılıkların belirlenmesine gereksinim vardır. Bu amaçla bu çalışmada, CLSI ile yorumlanmış olan 1650 test sonucu EUCAST sınır değerlerine göre yine yorumlanmış ve aradaki fark belirlenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tarih aralığı: Bu çalışma 1 Ocak 2012 ve 31 Aralık 2013 arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda izole edilen suşları kapsamaktadır.

İzolatlar: Araştırma, *Acinetobacter baumannii* (n=620), *Escherichia coli* (n=577) ve *Pseudomonas aeruginosa* (n=453)’yü kapsayan toplam 1650 izolatta yürütülmüştür.

Bakteri tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri: Bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix System (Beckton Dickinson, ABD) tanımlama kitleri ile yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları ($\mu\text{g/ml}$) EUCAST sınır değerlerine göre yine yorumlanmıştır. “Orta dirençli” izolatlar her iki değerlendirilmede de “dirençli” grubuna alınmıştır. Her üç bakteri için de çalışmaya dâhil edilen antibiyotiklerin CLSI ve EUCAST sınır değerleri tablolar hâlinde sunulmuştur (Tablo 1-3).

Tablo 1. *Acinetobacter baumannii* izolatları için CLSI ve EUCAST direnç sınır değerleri.

	CLSI		EUCAST	
	S	R	S	R
Amikasin	≤16	≥64	≤8	>16
Gentamisin	≤4	≥16	≤4	>4
Siprofloksasin	≤1	≥4	≤1	>1
Levofloksasin	≤2	≥8	≤1	>2
İmipenem	≤4	≥16	≤2	>8
Meropenem	≤4	≥16	≤2	>8
Kolistin	≤2	≥4	≤2	>2

S: Duyarlı; R: Dirençli

Tablo 2. *Pseudomonas aeruginosa* izolatları için CLSI ve EUCAST direnç sınır değerleri.

	CLSI		EUCAST	
	S	R	S	R
Amikasin	≤16	≥64	≥64	>16
Gentamisin	≤4	≥16	≥16	>4
Siprofloksasin	≤1	≥4	≥4	>1
Levofloksasin	≤2	≥8	≥8	>2
Seftazidim	≤8	≥16	≥32	>8
Sefepim	≤8	≥16	≥32	>8
İmipenem	≤2	≥4	≥8	>8
Meropenem	≤2	≥4	≥8	>8
Kolistin	≤2	≥4	≥8	>4

S: Duyarlı; R: Dirençli

İstatistiksel analiz: İstatistiksel analiz ki-kare yöntemine göre yapılmıştır.

BULGULAR

Tablo 4’te izolatların ADT sonuçlarının CLSI ve EUCAST ile karşılaştırması gösterilmektedir.

Tablo 3. *Escherichia coli* izolatları için CLSI ve EUCAST direnç sınır değerleri.

	CLSI		EUCAST	
	S	R	S	R
Amikasin	≤16	≥64	≤8	>16
Siprofloksasin	≤1	≥4	≤0.5	>1
Sulbaktam/Ampisilin	≤8/4	≥32/16	≤8	>8
Amoksisilin/Klavulanat	≤8/4	≥32/16	≤8	>8
Seftazidim	≤4	≥16	≤1	>4
Sefepim	≤8	≥32	≤1	>4
Sefotaksim	≤1	≥4	≤1	>2
TMP/SXT	≤2/38	≥4/76	≤2	>4
İmipenem	≤1	≥4	≤2	>8
Meropenem	≤1	≥4	≤2	>8

S: Duyarlı; R: Dirençli; TMP/SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol

Yapılan istatistiksel analiz sonucu gruplar arasında anlamlı fark gösterilememiştir ($p>0.05$).

Hem CLSI hem de EUCAST standartlarında bazı antibiyotiklerde direnç oranları birebir aynı bulunmuştur. *A. baumannii* izolatlarında; gentamisin, siprofloksasin, *P. aeruginosa* izolatlarında; gentamisin, seftazidim, sefepim, meropenem; *E. coli* izolatlarında ise; sulbaktam/ampisilin, sefotaksim ve TMP/SXT antibiyotikleri birebir aynı saptanmıştır.

CLSI ve EUCAST standartları karşılaştırıldığında, EUCAST'a göre *A. baumannii* amikasinine (%2.8) ve levofloksasine (%1.7) daha dirençli bulunmuştur. *A. baumannii*'de kolistin sonucunda çok az bir fark vardır; (%0.2) EUCAST'a göre daha duyarlıdır.

Tablo 4. *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* izolatlarında antibiyotik direnç oranlarının CLSI ve EUCAST standartlarına göre karşılaştırılması.^a

	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=620)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=453)		<i>Escherichia coli</i> (n=577)	
	CLSI n (%)	EUCAST n (%)	CLSI n (%)	EUCAST n (%)	CLSI n (%)	EUCAST n (%)
Amikasin	437 (70.5)	455 (73.3)	25 (5.5)	45 (9.9)	15 (2.6)	10 (1.7)
Gentamisin	514 (82.8)	514 (82.8)	75 (16.6)	75 (16.6)	-	-
Siprofloksasin	550 (88.7)	550 (88.7)	96 (21.3)	127 (28.3)	205 (35.6)	212 (36.8)
Levofloksasin	545 (87.9)	556 (89.6)	126 (27.8)	171 (37.7)	-	-
Sulbaktam/Ampisilin	-	-	-	-	321 (55.6)	321 (55.6)
Amoksisilin/Klavulanat	-	-	-	-	206 (35.8)	221 (38.3)
Seftazidim	-	-	120 (26.5)	120 (26.5)	121 (20.9)	97 (16.8)
Sefepim	-	-	132 (29.2)	132 (29.2)	118 (20.5)	127 (22.1)
Sefotaksim	-	-	-	-	116 (20.1)	116 (20.1)
TMP/SXT	-	-	-	-	248 (42.9)	248 (42.9)
İmipenem	533 (85.9)	535 (86.3)	143 (31.6)	137 (30.3)	0	0
Meropenem	540 (87.1)	542 (87.4)	150 (33.1)	150 (33.1)	0	0
Kolistin	16 (2.6)	15 (2.4)	4 (0.9)	3 (0.7)	-	-

^a Çalışılan tüm parametrelerde $p>0.05$ olarak saptanmıştır.
TMP/SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol

P. aeruginosa için fark; siprofloksasin (%7), levofloksasin (%9.7) ve amikasinde (%4.5) saptanmıştır. CLSI standartlarıyla karşılaştırıldığında, EUCAST'e göre daha dirençli bulunmuştur. İmipenem (%1.3) ve kolistin (%0.2) EUCAST'a göre daha duyarlı olarak bulunmuştur.

E. coli için, amikasin (%0.9) ve seftazidim (%4.2) EUCAST'a göre yorumlandığında daha duyarlı olarak bulunmuştur. Siprofloksasin (%1.2), amoksisilin/klavulanat (%2.5), sefepim (%1.6) ise EUCAST'e göre yorumlandığında daha dirençli olarak bulunmuştur. *E. coli* izolatlarında imipenem ve meropenem direncinin saptanmaması nedeniyle gruplar arasında uyum olup olmadığı anlaşılamamıştır. Her iki standardın kabul ettiği duyarlılık sınır değerlerinin farklı olması (CLSI için $\leq 2 \mu\text{g/ml}$; EUCAST için $\leq 1 \mu\text{g/ml}$) nedeniyle, dirençli izolatların bulunması durumunda uyumsuzluk görülebilirdi.

CLSI standartları esas alınarak EUCAST'ın seçicilik, duyarlılık, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri analiz edilmiştir. *A. baumannii*'de tüm antibiyotiklere karşı seçicilik %100 bulunurken, duyarlılık en düşük levofloksasinde saptanmıştır. EUCAST sınır değerleri *A. baumannii* için iyi uyum göstermiştir.

P. aeruginosa için seçicilik en düşük levofloksasinde (%86.4) saptanmıştır. Amikasin, gentamisin, seftazidim, siprofloksasin, meropenem, sefepim ve levofloksasin için seçicilik %100 saptanmıştır.

E. coli için, sulbaktam/ampisilin, TMP/SXT, sefuroksim ve siprofloksasinde %100 olarak bulunurken seçicilik en düşük seftazidimde (%82.6) saptanmıştır.

TARTIŞMA

Antibiyotik direncindeki artış ülkemizde giderek artan bir sorun hâline gelmiştir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (ADT) zamanında ve doğru yorumlanması çok önemlidir. Sınır değerlere göre duyarlı ya da dirençli olarak sınıflandırma, tedaviye yön vermesi açısından oldukça önemlidir. Antibiyotik duyarlılık testleri ülkemizde bugüne değin CLSI standartlarına göre yorumlanmakta iken, 2015 yılından itibaren EUCAST standartlarına geçiş süreci başlamıştır. Ülkemizin EUCAST standartlarına geçtiği bu dönemde iki rehber arasındaki direnç oranlarındaki farklılıkların belirlenmesine gereksinim vardır.

P. aeruginosa suşları incelendiğinde gentamisin, seftazidim, meropenem ve sefepim antibiyotikleri için her iki rehber tamamen uyumlu bulunmuştur. EUCAST rehberi CLSI rehberine göre siprofloksasin (%7), levofloksasin (%9.7) ve amikasin (%4.5) antibiyotiklerinde daha dirençli sonuçlar ortaya çıkarmıştır. İmipenem (%1.3) ve kolistin (%0.2) antibiyotikleri ise EUCAST standartlarıyla yapılan değerlendirmede CLSI rehberine göre, daha az oranda duyarlı olarak bulunmuştur. Yine de saptanan bu farklar istatistiksel olarak analiz edildiğinde anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Hombach M ve ark.⁽⁴⁾ yaptığı çalışmada, amikasin direnç oranı her iki rehberde de birebir aynı olarak bulunmuştur. EUCAST rehberi ile yapılan değerlendirmede CLSI rehbe-

rine göre sefepim, meropenem ve imipenem direnç oranlarında sırasıyla %12.2'den %19.8'e, %20.6'dan %27.7'ye, %25.5'ten %30.4'e yükselmiştir. Gentamisin, siprofloksasin ve levofloksasin direnç oranlarında ise CLSI rehberi ile yapılan değerlendirmede daha yüksek direnç oranları saptanmıştır (sırasıyla %18.6-%25.2; %15.9-%21.3; %29.7-%30.8).

Wolfensberger ve ark.⁽⁵⁾ yaptıkları çalışmada da, meropenem için EUCAST rehberi esas alındığında CLSI rehberine göre direnç oranları istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.002$). Sefepim ve tobramisin için ise her iki rehber tamamen uyumlu saptanmıştır. Her üç çalışmada da, özellikle sefepim için EUCAST rehberiyle yapılan değerlendirmelerin daha yüksek direnç oranları saptadığı görülmektedir.

A. baumannii suşları incelendiğinde, gentamisin (%82.8), siprofloksasin (%88.7) antibiyotiklerinin direnç oranları her iki rehberde tamamen uyumlu bulunmuştur. İmipenemde %0.4 meropenemde ise %0.3 olmak üzere rehberler arasında fark bulunmaktadır. Çalışmanın yapıldığı 2013 yılında, CLSI direnç sınır değerlerini her iki antibiyotik için $S\leq 4$ - $R\geq 16$ 'dan 2016'da $S\leq 2$ - $R\geq 16$ 'ya olacak şekilde revize etmiştir. EUCAST ise direnç sınır değerlerinde değişiklik yapmamıştır ($S\leq 2$ - $R\geq 8$). EUCAST'a göre *A. baumannii* suşları amikasine (%2.8) ve levofloksasine (%1.7) daha dirençli bulunmuştur. Kolistin (%0.2) direnç oranları ise CLSI'ya göre daha dirençli bulunmuştur. Direnç oranlarında saptanan bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Hombach ve ark.⁽⁴⁾ ise yaptıkları çalışmada, tobramisin ve gentamisin için EUCAST rehberi esas alındığında CLSI rehberine göre direnç oranları istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla %15.9-%25.4, %34.9-%44.4). Siprofloksasin (%45.2), imipenem (%33.3) ve amikasin (%34.9) antibiyotiklerinin direnç oranları karşılaştırıldığında ise her iki rehber uyumlu bulunmuştur.

E. coli suşlarındaki direnç oranları incelendiğinde çalışmamızda, trimetoprim/sulfametoksazol (%43) ve sulbaktam/ampisilin (%55.6) için her iki rehber tamamen uyumlu saptanmıştır. Van der bij ve ark.⁽⁶⁾ yaptıkları çalışmada, çalışmamızla uyumlu şekilde trimetoprim/ sulfametoksazol direnç oranlarını her iki rehber için tamamen uyumlu bulmuşlardır. Bununla birlikte, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefuroksım ve gentamisin direnç oranlarını da uyumlu bulmuşlardır. Seftazidim direnç oranları için, çalışmalarında, EUCAST rehberi daha dirençli sonuçlar verirken (%2-3), çalışmamızda CLSI rehberi esas alındığında direnç oranı (%21-16.8) daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda, sefepim için EUCAST rehberi ile yapılan değerlendirmede, CLSI rehberine göre daha yüksek direnç oranları saptanmıştır (%22.1-20.5). CLSI 2013 yılındaki sefepim direnç sınır değerlerini $S \leq 8$ - $R \geq 32$ 'den 2016'da $S \leq 2$ - $R \geq 16$ 'ya olacak şekilde revize etmiştir. EUCAST ise direnç sınır değerlerinde değişiklik yapmamıştır ($S \leq 2$ - $R \geq 8$). Wolfensberger ve ark.⁽⁵⁾ ile Hombach M ve ark.⁽⁴⁾ yaptıkları çalışmalarda, sefepim direnç oranlarını çalışmamızla uyumlu şekilde EUCAST rehberi esas alındığında daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla EUCAST %6.9-CLSI %4.2, EUCAST %8.2-CLSI %2.1).

Van der bij ve ark.⁽⁶⁾ yaptıkları çalışmada, seftazidim direnç oranları için, EUCAST rehberi ile istatistiksel olarak anlamlı daha dirençli sonuçlar bulmuşlardır ($p < 0.05$). Çalışmamızda ise, seftazidim direnç oranları (EUCAST %16.8, CLSI %21) istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, EUCAST rehberi esas alındığında, CLSI rehberine göre daha düşük saptanmıştır.

ADT raporları reçete politikası ve antibiyotik kullanımını etkilemektedir⁽⁷⁾. Birçok çalışmada kullanılan rehberin ADT raporları üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir^(8,9). ADT raporlamalarındaki değişikliklerin bilimsel

gereksinimler ve pratik uygulamalara elverişlilik açısından irdelenmesi ve çok merkezli çalışmalar eşliğinde yaşama geçirilmesi gerekmektedir⁽¹⁰⁾. Otomatize sistem üreticilerinin EUCAST'a geçiş sürecinde bazı antibiyotikler için direnç sınır değerlerinde değişikliklerde bulunduğu kullanımlar tarafından göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. CLSI. Clinical and Laboratory Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. Document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
2. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org> (Erişim Tarihi: Mart 2017)
3. Kaki R, Elligsen M, Walker S, Simor A, Palmay L, Daneman N. Impact of antimicrobial stewardship in critical care: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1223-30. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr137>
4. Hombach M, Bloemberg GV, Böttger EC. Effects of clinical breakpoint changes in CLSI guidelines 2010/2011 and EUCAST guidelines 2011 on antibiotic susceptibility test reporting of Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:622-32. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr524>
5. Wolfensberger A, Sax H, Weber R, Zbinden R, Kuster SP, Hombach M. Change of Antibiotic Susceptibility Testing Guidelines from CLSI to EUCAST: Influence on Cumulative Hospital Antibigrams. *PLoS One* 2013; 8:e79130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079130>
6. van der Bij AK, van Dijk K, Muilwijk J, et al. Clinical breakpoint changes and their impact on surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* causing bacteraemia. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:466-72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03996.x>
7. MacKenzie FM, Gould IM, Bruce J, et al. The role of microbiology and pharmacy departments in the stewardship of antibiotic prescribing in European hospitals. *J Hosp Infect* 2007; 65(Suppl 2):S73-81. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60019-X](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60019-X)
8. Hawser SP, Badal RE, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hsueh PR. Comparison of CLSI 2009, CLSI 2010 and EUCAST cephalosporin clinical breakpoints in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from the SMART Global Surveillance Study. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36:293-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.05.012>
9. Rodríguez-Ba-o J, Picón E, Navarro MD, López-Cerero L, Pascual A. Impact of changes in CLSI and EUCAST breakpoints for susceptibility in bloodstream infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:894-900. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03673.x>
10. Jenkins SG, Jerris RC. Critical assessment of issues applicable to development of antimicrobial susceptibility testing breakpoints. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9 Suppl):S5-10. <https://doi.org/10.1128/JCM.00837-11>

Balıkesir Bölgesinden Toplanan Liken Örneklerine Ait Özütlerin *Escherichia coli* ATCC 25922 Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri§

Ezgi UÇARKUŞ*, Barış GÖKALSIN*, Nazlıhan YILDIRIM*, Birkan AÇIKGÖZ*,
Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU**, N. Cenk SESAL**

*Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, İstanbul

**Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, Balıkesir çevresinden toplanan *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. ve *Parmelia sulcata* Taylor liken türlerine ait aseton özütlerinin *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu üzerindeki antibakteriyel etkinliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Balıkesir ilinden toplanan liken örneklerinin türleri teşhis edildikten sonra aseton özütleri elde edilmiştir. Liken aseton özütlerinin *Escherichia coli* üzerindeki antibakteriyel ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak kanamisin antibiyotiği kullanılmış ve MİK değeri belirlenerek antibakteriyel etkinliklerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Bulgular: Liken aseton özütleri ve kanamisin 2.5-40 µg/ml arasındaki dozları denenmiştir. Kanamisin yalnızca 40 µg'lık dozunda antibakteriyel etkinlik gözlemlenmiş ve MİK değeri 40 µg olarak belirlenmiştir. *Parmelia saxatilis* likenine ait aseton özütünün MİK değeri 20 µg/ml, *Parmelia sulcata* likeni aseton özütünün MİK değeri ise 40 µg/ml olarak saptanmıştır.

Sonuç: *Parmelia saxatilis* aseton özütünün *Escherichia coli* üzerinde kanamisin etkinliğinden daha düşük dozda antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu, *Parmelia sulcata* aseton özütünün ise kanamisin ile aynı dozda antibakteriyel etkinlik gösterdiği görülmüştür. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, gerekli testler yapıldıktan sonra yüksek antibakteriyel potansiyele sahip liken özütlerinden tedaviye yararlanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel etkinlik, *Escherichia coli*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata*

ABSTRACT

Antibacterial Activities of Extracts of Lichen Samples Collected from Balıkesir Region on *Escherichia coli* ATCC 25922

Objective: In this study, it was aimed to determine the antibacterial activity of acetone extracts of *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. and *Parmelia sulcata* Taylor lichen species that were collected from Balıkesir district, on the strain of *Escherichia coli* ATCC 25922.

Material and Methods: After lichen samples collected from Balıkesir province were identified, the acetone extracts were obtained. Antibacterial and minimum inhibitory concentration (MIC) tests of the acetone extracts of lichens on *Escherichia coli* were performed via microdilution method. The antibiotic kanamycin was used as control group and a MIC value of the antibiotic was determined for comparison of antibacterial activities of the lichen acetone extracts.

Results: Lichen acetone extracts and kanamycin dosages ranging between 2.5-40 µg/ml were tested. Kanamycin showed antibacterial activity at only concentration of 40 µg/ml and its MIC value was determined as 40 µg/ml. MIC values were also defined for the acetone extract of *Parmelia saxatilis* (20 µg/ml), and *Parmelia sulcata* (40 µg/ml).

Conclusion: The acetone extract of *Parmelia saxatilis* had antibacterial effect on *Escherichia coli* much lower than that of kanamycin. The acetone extract of *Parmelia sulcata* also showed antibacterial activity that equals to those of kanamycin. According to the results that were obtained from this study, it has been predicted that lichen extracts that have higher antibacterial potential may be useful for treatment of bacterial infections in case essential tests are performed.

Keywords: Antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata*

Alındığı tarih: 07.01.2016

Kabul tarihi: 10.03.2017

Yazma adresi: Gülşah Özyiğitoğlu, Marmara Üniversitesi Göztepe Kampüsü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kadıköy / İstanbul
e-posta: gcoban@marmara.edu.tr

§ Bu çalışma 2. IVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi'nde (27-29 Kasım 2015, İstanbul) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

§ Bu çalışma TÜBİTAK 113S306-COST FA 1202 numaralı proje ile desteklenmiştir.

GİRİŞ

Likenler, mantarların (mikobiyont) ve alglerin ve/veya siyanobakterilerin (fotobiyont) simbiyotik birliktelikleri sonucu morfolojik ve fizyolojik etkileşimleriyle meydana gelen organizmalardır⁽¹⁾. Arktik bölgelerden tropikal bölgelere kadar geniş bir ekosistemde yayılış gösteren yaklaşık 25 bin liken türü bulunmaktadır⁽²⁾. Likenler yaygın olarak toprakta, kayaların, ağaçların ve diğer bitkilerin üzerinde gelişim gösterirler⁽³⁾. Bazı liken türlerinin antik çağlardan beri parfümeri, boya ve kimya endüstrisinde kullanıldığı bilinmektedir⁽⁴⁾. Bunun yanında, tıp ve eczacılık alanlarında, tarihte ve günümüzde likenlerden yararlanılmaktadır^(5,6).

Likenler, mikobiyont partnerleri tarafından yalnızca liken oluşturdıklarında sentezlenen ve çoğunluğu likenlere özgü olan sekonder metabolitlere sahiptir⁽⁷⁾. Genellikle asit bileşikler olmalarından dolayı “liken asitleri” olarak da adlandırılan bu liken maddeleri sayesinde likenler antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan ve antitümör gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler⁽⁸⁻¹⁰⁾. Liken sekonder metabolitlerinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkinlikleri, son zamanlarda literatürde yer alan çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır⁽¹¹⁻¹³⁾.

İnsan nüfusunu ciddi şekilde tehdit eden ve en sık görülen patojen bakterilerden biri de *Escherichia coli*'dir. *Enterobacteriaceae* familyasının en önemli türlerinden biri olan *E. coli*, insan bağırsak mikroflorasında bulunan Gram negatif bir bakteridir⁽¹⁴⁾. *E. coli* suşları içerisinde, bağırsak ve bağırsak dışı çeşitli hastalıklara neden olan suşlar yer almaktadır. İdrar yolu enfeksiyonu bu hastalıkların en önemlilerinden biridir. Bunun yanında, septisemi, menenjit ve peritonit gibi hastalıklara yol açtığı da bilinmektedir^(15,16). Kadınların yaklaşık olarak %50'sinin yaşamları boyunca en az bir kez *E. coli*'den kaynaklı idrar yolu enfeksiyonuna

maruz kaldıkları rapor edilmiştir⁽¹⁷⁾. *E. coli*'nin kullanılan antibiyotiklerin türüne, kullanım dozuna ve süresine bağlı olarak antibiyotik direnci geliştirdiği ve kronik enfeksiyonlara neden olduğu durumlar rapor edilmiştir⁽¹⁸⁾. Bazı dirençli *E. coli* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarla mücadelede farmakolojik potansiyeli olan biyolojik materyallerin araştırılması yönünde çalışmalar yapılmaktadır⁽¹⁹⁾. Likenler, yeni antibiyotikler elde edilebilecek aday organizmalar olarak bu biyolojik materyaller arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada, farmakolojik potansiyele sahip oldukları bilinen liken türlerinden *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. ve *Parmelia sulcata* Taylor aseton özütlerinin *E. coli* bakterisi üzerinde, antibakteriyel etkinliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Kontrol grubunda *E. coli* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan kanamisin antibiyotiği kullanılmıştır⁽²⁰⁾.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakterinin çoğaltılması

Bakteri suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Bakterinin kanlı agar besiyerine inokulasyonu gerçekleştirilerek bir gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Katı kültürler 4°C'de saklanmış, deneyde kullanılmak üzere Luria-Bertani sıvı besiyerine (LB) inoküle edildikten sonra 1 gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. LB sıvı besiyeri bakterilerin hızlı ve kolay bir şekilde üreyebildikleri bir ortam olduğu için tercih edilmiştir⁽²¹⁾.

Liken Aseton Özütlerinin Elde Edilmesi

Balıkesir bölgesinden toplanan liken örneklerinin öncelikle türleri tanımlanmıştır. *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. ve *Parmelia sulcata* Taylor olarak belirlenen iki türe ait örnekler distile su ile yıkandıktan sonra kurutulmaya bırakılmıştır. Kuru liken örneklerinin her birinden 3 g tartıla-

rak steril havanlara alınmış ve herhangi bir çözücü eklenmeden steril tokmaklar ile ezilerek toz hâline getirilmiştir. Toz hâlindeki liken örnekleri steril falkon tüplere aktarılmış ve üzerlerine çözücü olarak 35 mL aseton eklenmiştir. Liken örnekleri aseton çözücüsü içerisinde 24 saat boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiş, daha sonra kurutma kağıdı ile süzülerek steril cam petrilere aktarılmıştır. Cam petrilere bulunan liken özütleri, çözücülerinin uçması için petrilere üzerine filtre kâğıtları konularak çeker ocakta 24 saat bekletilmiştir. Çözücülerini uçuttan sonra toz hâlindeki liken özütleri steril santifüj tüplerine alınmış ve her bir liken özütüne ait toz ağırlıklar tartılarak kaydedilmiştir. *P. saxatilis* ve *P. sulcata* liken örneklerine ait toz hâlindeki aseton özütleri %100'lük 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözülmüştür. Yüzde 100 DMSO içerisinde çözünmüş olan liken aseton özütlerinden 60 µl alınmış ve distile su ile 1000 µl'ye ile tamamlanarak deneylerde DMSO oranı %6 olacak şekilde seyreltilmiştir.

Antibakteriyel MİK testleri

Antibakteriyel etkinliğin saptanması sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 96'lık mikropalak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mikropalak kuyucuklarına sırasıyla 100 µl LB Broth besi yeri, 100 µl 0.5 McFarland *E. coli* bakteri süspansiyonu ve final

konsantrasyonları 2.5-40 µg/ml arasında değişen *P. saxatilis* ve *P. sulcata* liken aseton özütleri eklenmiştir. Kontrol grubu olarak, kanamisin antibiyotiği kullanılmıştır. Distile su ile çözülerek 50 mg/ml konsantrasyonunda kanamisin stok çözeltisi hazırlanmış ve deneylerde kullanılmak üzere seyreltilerek 2.5-40 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda kuyucuklara eklenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak yalnızca besiyeri ve *E. coli* bakterisi içeren kuyucuk, negatif kontrol olarak ise aseton ve besiyeri içeren kuyucuklar kullanılmıştır. Mikropalak 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiş ve bakteri konsantrasyonları 625 nm'de mikropalak okuyucuda (BioTek) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bakteri üremesini engelleyen gruplar etkili olarak belirlenmiştir. Bakteri konsantrasyonunu tamamen inhibe eden en düşük dozlar MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Tüm testler 3 kez yinelenmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada Balıkesir Kazdağları yöresinden, yaklaşık 1200 metre yükseklikten toplanan *Parmelia saxatilis* ve *Parmelia sulcata* liken türlerine ait aseton özütlerinin *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri test edilmiş ve deneysel olarak elde edilen veriler Tablo 1'de gösterilmiştir. Liken aseton özütleriyle karşılaştırma amaçlı kanamisin antibiyotiği kullanılmıştır.

Tablo 1. Liken aseton özütleri ile kanamisin antibiyotiğinin *Escherichia coli* üzerine antibakteriyel MİK değerleri

Gruplar		<i>E. coli</i> + kanamisin				
Doz (μg/ml)	40	20	10	5	2.5	
24. saatte bakteri konsantrasyonu (cfu/mL)	~0	1.5x10 ⁸	3x10 ⁸	9x10 ⁸	9x10 ⁸	
		<i>E. coli</i> + <i>P. saxatilis</i>				
Doz (μg/ml)	40	20	10	5	2.5	
24. saatte bakteri konsantrasyonu (cfu/mL)	~0	~0	3x10 ⁸	6x10 ⁸	9x10 ⁸	
		<i>E. coli</i> + <i>P. sulcata</i>				
Doz (μg/ml)	40	20	10	5	2.5	
24. saatte bakteri konsantrasyonu (cfu/mL)	~0	10 ⁸	3x10 ⁸	6x10	9x10 ⁸	

Spektrofotometrik olarak yapılan ölçümler sonucunda, kanamisin 40 µg/ml'lik konsantrasyonunu antibakteriyel etkinlik göstermiş fakat düşük dozlarla beraber antibakteriyel etkinliği de azalmıştır.

Test edilen iki liken türünden *P. saxatilis* aseton özütünün, hem 40 µg/ml hem de 20 µg/ml'lik konsantrasyonunun antibakteriyel etkinlik gösterdiği ve böylece kanamisinin etkin dozundan daha düşük dozda dahi antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu saptanmıştır. *P. sulcata*'ya ait aseton özütünün ise 40 µg/ml'lik konsantrasyonunda kanamisinle aynı dozda antibakteriyel etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, her iki liken aseton özütünün azalan dozlarının bakteri konsantrasyonunu inhibe ettikleri saptanmıştır. Bu veriler kontrol amaçlı kullanılan antibiyotiklerle kıyaslandığında, liken özütlerinin oldukça etkili antibakteriyel potansiyeli, likenlerin ileride yeni antibiyotikler olarak kullanılabileceğinin sinyallerini vermiştir.

TARTIŞMA

Bakteriyel enfeksiyonlar ve hastalıkların tedavisi için gereksinim duyulan antibiyotik ilaçların elde edilmesinde bitkisel kaynaklardan yıllardan beri yararlanılmaktadır. Bunun yanı sıra birçok türü bu açıdan potansiyele sahip olan likenlerin de son zamanlarda önemi artmaktadır. Bu çalışmada, patojenik suşlarının geliştirdiği antibiyotik direnci ile kronik enfeksiyonlara yol açma potansiyeli bulunan *E. coli*'ye karşı iki liken türünün (*P. saxatilis* ve *P. sulcata*) antibakteriyel etkinlikleri saptanmıştır. Literatürde bu ve benzeri türlerle yapılan çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında, liken örneklerinin toplandığı habitat, liken özütü eldesinde kullanılan çözücüler ve yöntem basamaklarındaki bazı farklı uygulamalar bulunmaktadır. Dolayısıyla elde edilen bulgular, bir kısmı ile benzerlik gösterir-

ken bir kısmı ile de farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda *E. coli*'ye karşı test edilen kanamisin antibiyotiğinin yalnızca en yüksek doz olan 40 µg/ml konsantrasyonunda etkinlik gösterdiği ve bunun yanında *P. sulcata* likeninin aseton özütünün kanamisin ile aynı dozda antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak Stojanovic ve ark.⁽²²⁾'nin çalışmasında, *P. sulcata* likenine ait metanol özütünün 1 mg/ml MİK değeri ile *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Buna ilaveten, çalışmamızdaki *P. sulcata* aseton özütünün MİK değerinin 40 µg/ml olarak bulunması, asetonun liken sekonder metabolitlerinin yüksek oranda ve etkinlikte elde edilmesi için metanol'den daha ideal bir çözücü olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Candan ve ark.⁽²³⁾'nin çalışmasında ise, *P. sulcata* aseton özütünün *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus faecalis* gibi Gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinliği tespit edilmiş ve MİK değeri 40 µg/ml olarak bulunmuştur. Buna karşılık, çalışmamız sonucunda *P. sulcata* aseton özütünün yalnızca Gram pozitif bakteriler üzerinde değil, Gram negatif bakteriler üzerinde de etkinliğe sahip olabileceği belirlenmiştir.

Yine çalışmamızda, *P. saxatilis* aseton özütünün *E. coli* üzerinde kanamisinden daha düşük dozda antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu (MİK değeri 20 µg/ml) saptanmıştır. Kosanic ve ark.⁽²⁴⁾ tarafından yapılan çalışmada ise, *P. saxatilis* aseton özütünün hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler üzerinde etkinlik gösterdiği, ancak *E. coli* bakterisi dirençli formda olduğu için bu bakteri üzerinde etkinlik göstermediği rapor edilmiştir. Kosanic ve ark.⁽²⁵⁾ tarafından yapılan diğer bir çalışmada da, *P. saxatilis* ve *P. sulcata* türlerinin *E. coli*'ye karşı etkili olmadığı rapor edilmiştir. *P. caperata* (L.) Ach., *P. sulcata* ve *P. saxatilis* aseton özütlerinin antibakteriyel ve antifungal etkinliklerinin test edildiği çalışmada⁽²⁵⁾, *E. coli* üzerinde *P. caperata* ve

P. sulcata türlerinin etkinlik gösterdiği, *P. saxatilis* aseton özütünün ise etkili olmadığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda farklı olarak, aynı bakteriye karşı *P. saxatilis* aseton özütünün *P. sulcata* aseton özütünden daha fazla etkinlik gösterdiği görülmüştür. Liken türlerinin toplandığı bölgenin fiziksel koşullarının ve liken özütlerinin eldesindeki basamakların farklı olması, liken türlerinin antibakteriyel etkinliklerini etkileyebilmektedir.

Güllüce ve ark.⁽²⁶⁾'nın yaptığı bir çalışmada, Artvin bölgesinden toplanan *P. saxatilis* liken türüne ait metanol özütünün *E. coli* üzerinde antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiş ve MİK değeri 15.62 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, kontrol grubu olarak kullanılan antibiyotikğin MİK değeri 30 µg/ml olarak belirlenmiş ve *P. saxatilis* metanol özütünün antibiyotikten daha fazla antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, *P. saxatilis*'in antibakteriyel etkinliğinin toplandığı bölgeye ve özüt çıkarma işlemleri sırasında kullanılan çözücüye göre değişiklik gösterebileceği anlaşılmaktadır. *P. saxatilis* özütünün, içerdiği sekonder metabolitler itibarıyla de antibiyotikğin etkin dozundan daha düşük dozda etkinlik gösterdiği görülmüştür.

Likenlerden elde edilen liken asitlerinin ayrı ayrı antibakteriyel etkinliklerinin incelendiği çalışmalar da bulunmaktadır^(27,28). Çalışmamızda kullandığımız iki *Parmelia* türünün de yer aldığı Manojlovic ve ark.⁽²⁷⁾'nin çalışmasında, *P. sulcata*'da salazanik asit, protosettrarik asit, atranorin ve kloroatranorin; *P. saxatilis*'te ise salazanik asit, usnik asit, atranorin ve kloroatranorin maddeleri tespit edilmiştir. Bunlardan salazanik asit, sroto-settrarik asit, atranorin, kloroatranorin ve usnik asidin *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri test edilmiş ve bu maddeler içerisinde en etkili olarak 250 µg/ml MİK değeri ile usnik asit bulunmuştur. Bizim çalışmamızdaki *P. sulcata* ve *P. saxatilis* aseton özütlerinin *E. coli*'ye karşı

gösterdiği güçlü antibakteriyel etkinliğin, bu maddeler ve bu maddelere ek olarak toplandığı bölgeye göre değişebilen farklı sekonder metabolitlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Liken özütleri içerisinde yer alan sekonder metabolitlerin bir arada bulunmasında antagonistik ya da sinerjistik etkiler sonucu antibakteriyel etkinliklerinin değişebileceği görülmektedir.

Türkiye'de farklı liken türlerine ait özütlerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri üzerine yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır⁽²⁹⁻³¹⁾. Çobanoğlu ve ark.⁽³²⁾'nin yaptıkları çalışmada, Bolu ve Isparta bölgelerinden toplanan liken türlerinin kloroform ve metanol özütlerinin 4 bakteri (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*) ve 1 maya (*Candida albicans*) türü üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri test edilmiştir. Çalışmada, kloroform kullanılarak elde edilen liken özütlerinin, metanol kullanılarak elde edilen liken özütlerinden daha yüksek oranda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Akkol ve ark.⁽³³⁾'nin yaptıkları çalışmada, Kütahya bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf liken türünün biyolojik aktiviteleri test edilmiştir. Metanol, diklorometan ve etil asetat olmak üzere 3 farklı çözücü kullanılmış ve özütler Gram negatif ve Gram pozitif bakteri türleri ile maya türleri üzerinde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* bakteri türleri üzerinde, 3 farklı çözücünden elde edilen liken özütlerinin hiçbirinin etki göstermediği görülmüştür.

Türkiye'de yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile çalışmamızdan elde edilen çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde, liken türlerinin antibakteriyel etkinlikleri toplanılan bölgeye ve liken özütleri elde edilirken kullanılan çözücüler ve yöntemlerin farklılığına göre değişiklik gösterdiği görülmektedir. Likenlerin

bulundukları bölgelerin nemlilik ve hava kirliliği oranları, hava sıcaklık ve ışık farklılıkları gibi parametrelerin, sekonder metabolitlerin sentezlenmesi aşamalarında rol sahibi oldukları, bunun bir sonucu olarak da antimikrobiyal aktivitelerin değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, liken özütleri elde edilirken kullanılan çözücüler de likenlerin antimikrobiyal etkinliklerini etkilemektedir.

Çalışmamızdan elde edilen veriler ile literatürde yer alan diğer çalışmaların sonucunda, *P. saxatilis* ve *P. sulcata* aseton özütlerinin *E. coli* üzerinde antibakteriyel etkinliklere sahip olduğu ve bu sonuçlar değerlendirildiğinde, bu türlerin gerekli testler gerçekleştirildikten sonra antibiyotiklere yardımcı ya da alternatif olabilecek potansiyel biyolojik materyaller arasında yer alabilecekleri ortaya koyulmuştur. Aynı liken türlerinin antibakteriyel etkinliklerinde görülen farklılıklar, örneklerin toplandığı bölgelere ve özüt çıkarırken kullanılan çözücülere göre değişebilmektedir. Bu nedenle benzer çalışmaların daha çok sayıda yapılması ile daha geniş kapsamlı veriler elde edilebilecektir. Çalışmamızın, bu alandaki diğer çalışmalar için bir kaynak olabileceği, likenlerin antibakteriyel etkinliğinin tespit edilmesi açısından yararlanılabilecek bir çalışma olduğu öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bates ST, Cropsey GW, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Appl Environ Microb* 2011; 77:1309-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.02257-10>
2. Muggia L, Schmitt I, Grube M. Lichens as treasure chests of natural products. *Sim News* 2009; 59:85-97.
3. Vráblíková H, McEvoy M, Solhaug KA, Barták M, Gauslaa Y. Annual variation in photo acclimation and photoprotection of the photobiont in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *J Photoch Photobio B* 2006; 83:151-62. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.019>
4. Kirmizigül S, Koz O, Anil H, Icli S. Isolation and structure elucidation of novel natural products from Turkish lichens. *Turk J Chem* 2003; 27:493-500.
5. Grube M, Cardinale M, de Castro JV Jr, Müller H, Berg G. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *ISME J* 2009; 3:1105-15. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.63>
6. Çobanoğlu G, Yavuz M. Tıp tarihinde likenlerle tedavi. *Yeni Tıp Tarihi Araştırmaları* 2003; 9:37-90.
7. Johnson CJ, Bennett JP, Biro SM, et al. Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens. *PLoS One* 2011; 6:e19836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019836>
8. Kosanić M, Ranković B. Screening of antimicrobial activity of some lichen species in vitro. *Kragujevac J Sci* 2010; 32:65-72.
9. Çobanoğlu G, Sesal C, Gökmen B, Çakar S. Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. *South-West J Horticult Biol Environ* 2010; 1:153-8.
10. Verma N, Behera BC. Future directions in the study of pharmaceutical potential of lichens. In: Lichen Secondary Metabolites. *Springer International Pub* 2015:179-202. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13374-4_8
11. Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem Toxicol* 2013; 53:112-8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.034>
12. Açıköz B, Karaltı İ, Ersöz M, Coşkun MZ, Çobanoğlu G, Sesal C. Screening of antimicrobial and cytotoxic effects of two Cladonia species. *Z Naturforsch C* 2013; 68:191-7. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2013.68c0191>
13. Segatore B, Bellio P, Setacci D, et al. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. *Phytomedicine* 2012; 19:341-7. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.012>
14. Malhotra R, Sikka R, Chaudhary U. Antimicrobial sensitivity pattern among clinical isolates of *Escherichia coli* in tertiary care centre of Northern India. *Int J Res Med Sci* 2016; 4:639-42. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20160330>
15. Kahlmatter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:45-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.013>
16. Davoud K, Shahla M. Emergence of multiple β-lactamases produced by *Escherichia coli* clinical isolates from hospitalized patient in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microb* 2010; 4:137-45.
17. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 2002; 113 (Suppl 1A):S5-13. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01054-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01054-9)
18. Zhang X, Li Y, Liu B, et al. Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China. *PLoS One* 2014; 9:e111026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111026>
19. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R. Quorum sensing

- and phytochemicals. *Int J Mol Sci* 2013; 14:12607-19. <https://doi.org/10.3390/ijms140612607>
20. **Trissel LA.** Handbook on injectable drugs. 12th ed. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, 2003:819-22.
 21. **Sezonov G, Joselau-Petit D, D'Ari R.** *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* 2007; 189:8746-9. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
 22. **Stojanović I, Radulović N, Cvetković V, Mitrović T, Stamenković S.** Antimicrobial activity of methanol extracts of four Parmeliaceae lichen species. *FU Phys Chem Tech* 2013; 11:45-53. <https://doi.org/10.2298/FUPCT1301045S>
 23. **Candan M, Yılmaz M, Tay T, Erdem M, Türk AO.** Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Z Naturforsch C* 2007; 62:619-21. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-827>
 24. **Kosanić M, Šeklić D, Marković S, Ranković B.** Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of selected lichens from Serbia. *Dig J Nanomater Biostruct* 2014; 9:273-87.
 25. **Kosanić MM, Ranković BR, Stanojković TP.** Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *J Sci Food Agric* 2012; 92:1909-16. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5559>
 26. **Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, et al.** Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nyländeriana*. *Phytomedicine* 2006; 13:515-21. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.09.008>
 27. **Manojlovic N, Rankovic B, Kosanic M, Vasiljevic P, Stanojkovic T.** Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 2012; 19:1166-72. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.012>
 28. **Shrestha G, Raphael J, Leavitt SD, St. Clair LL.** In vitro evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens. *Pharm Bio* 2014; 52:1262-6. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.889175>
 29. **Cansaran-Duman D, Cetin D, Simsek H, Coplu N.** Antimicrobial activities of the lichens *Hypogymnia vittata*, *Hypogymnia physodes* and *Hypogymnia tubulosa* and HPLC analysis of their usnic acid content. *Asian J Chem* 2010; 22:6125-32.
 30. **Aydin S, Kinalioglu K.** The investigation of antibacterial activities of ethanol and methanol extracts of *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale (Parmeliaceae) and *Rocella phycopsis* Ach. (Roccellaceae) lichens collected from Eastern Blacksea Region, Turkey. *J Appl Pharm Sci* 2013; 3:143-7.
 31. **Akpınar AU, Ozturk S, Sinirtas M.** Effects of some terricolous lichens (*Cladonia rangiformis* Hoffm., *Peltigera neckerii* Hepp ex Müll. Arg., *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb.) on soil bacteria in natural conditions. *Plant Soil Environ* 2009; 55:154-8.
 32. **Çobanoğlu G, Sesal C, Açıkgöz B, Karaltı İ.** Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Physcia aipolia*, *Xanthoria parietina*, *Usnea florida*, *Usnea subfloridana* and *Melanohalea exasperata*. *Mod Phytomorphol* 2016; 10:19-24.
 33. **Güvenç A, Küpeli Akkol E, Süntar İ, Keleş H, Yıldız S, Çalış İ.** Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *J Ethnopharmacol* 2012; 144:726-34. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.021>

Diyabetik Ayak Enfeksiyonlarında Etken Bakteriler ve Biyofilm Oluşturma Oranları[§]

Ş. Barçın ÖZTÜRK, M. Bülent ERTUĞRUL, Esra ÇÖREKLİ

Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

ÖZ

Amaç: Yara yatağı bakterilerin üremesi için ideal bir yüzeydir ve mikrobiyal enfeksiyonun yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir. Bakteriler hemen her türlü yüzeye yapışarak, biyofilm olarak adlandırılan kompleks yapılı topluluklar oluştururlar. Çalışmamızın amacı diyabetik ayak enfeksiyonuna neden olan etkenleri ve biyofilm oluşturma oranlarını saptamaktır.

Gereç ve Yöntem: Enfekte diyabetik ülserlerinden alınan rutin kültür örnekleri, 2013-2015 yılları arasında Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda değerlendirildi. Kültür için örnekler, yumuşak doku debridmanı ve/veya kemik biyopsisi ile toplandı ve standart kültür ve tanımlama yöntemleri kullanılarak etken bakteriler tanımlandı. Biyofilm üretimi kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile saptandı.

Bulgular: Toplam 55 hastanın yumuşak ve/veya kemik dokusu örneklerinden 81 etken bakteri izole edildi. En sık izole edilen bakteri *Pseudomonas* spp. (n=16; %19.8) idi. Biyofilm oluşumu 67 izolatta (%82.7) saptandı. Birçok mikroorganizma türünde biyofilm oluşumu görülmekle birlikte, özellikle *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* türlerinde daha yaygın olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmalarımız diyabetik ayak enfeksiyonu etkenlerinin biyofilm oluşturmalarını önlemek veya biyofilmi ortadan kaldırmak için tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gereksinimini vurgulaması bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, diyabetik ayak, kronik yara

ABSTRACT

Bacterial Agents in Diabetic Foot Infections and Their Biofilm Formation Rates

Objective: The wound bed is an ideal surface for bacterial growth, and the deleterious effects of microbial infection on wound healing are recognized. Bacteria adhere to almost all types of surfaces, and form complex structures called biofilms. The aim of our study was to determine the bacteria and biofilm formation rates in diabetic foot.

Material and Method: Routine culture samples obtained from infected diabetic ulcers were evaluated in Infection Diseases and Clinical Microbiology laboratory between 2013-2015. We collected specimens for culture by debridement of the soft tissue and / or bone biopsy and effective bacterial agents were identified by using standard culture, and identification methods. The production of biofilm was studied by quantitative microdilution plate method.

Results: We isolated a total of 81 causative bacteria from soft and/or bone tissue samples in 55 patients. The most frequently isolated species was *Pseudomonas* (n=16; 19.8%). Sixty seven (82.7%) of 81 isolates produced biofilm. We found that biofilm was produced by many types of organisms, but it was particularly more common in *Staphylococcus* and *Pseudomonas* species.

Conclusion: We believe that our work is important in that it emphasizes the need to develop therapeutic strategies to eliminate and/or prevent biofilm formation in diabetic foot infection.

Keywords: Biofilm, diabetic foot, chronic wound

GİRİŞ

Ayak ülserleri diabetes mellitusun ciddi komplikasyonlarından olup, hastalarda yaşamları

boyunca %12-25 oranında ayak ülseri gelişme riski vardır⁽¹⁻³⁾. Yara yatağı bakteri çoğalması için ideal bir yüzeydir ve enfeksiyonun yara iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri olduğu

Alındığı tarih: 09.08.2016

Kabul tarihi: 22.03.2017

Yazışma adresi: Ş. Barçın Öztürk, Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

e-posta: barcinoturk@yahoo.com

[§] Bu çalışma Aydın International Symposium of Diabetic Foot (AISDF) (16-18 Ekim 2015, Aydın) sempozyumunda sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

gösterilmiştir^(4,5). Bu nedenle, yara enfeksiyonunun gelişmesine katkıda bulunan faktörleri tanımlamak, yara yönetiminde önem taşır⁽⁵⁾.

Bakteriler hemen her yüzeye yapışıp çoğalarak, biyofilm olarak adlandırılan yapısal olarak karmaşık topluluklar oluşturabilirler. Biyofilmdeki bakteriler, kendi oluşturdıkları ekstrasellüler matriks ile örtülü çok hücreli agregatlar içinde gelişirler^(6,7). Topluluktaki bakterilerin farklılaşması, maruz kaldıkları koşullara bağlıdır. Biyofilm içinde besin maddeleri, oksijen ya da elektron dengelerindeki değişikliklere yanıt olarak hücrelerin gen ifadeleri değişir^(8,9). Bakteri topluluklarının biyofilm içinde yaşamasının, birçok antibiyotiğe direnç sağlama, konak savunmasından korunma gibi çok sayıda yararı vardır⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Biyofilm, kronik yaralarda veya akut yarada kısmi kalınlık varlığı ile gösterilmiştir^(13,14). Yeni oluşan yaralarda, endojen (konakçı) ve eksojen kaynaklı çeşitli mikroorganizmalar yara yüzeyini kontamine edebilir. Yara yüzeyinin özellikleri, hangi mikroorganizmaların bağlanıp çoğalacağını ve buradaki erken biyofilm bileşenlerini belirlemede yardımcı olur⁽¹⁵⁾. İlginç olarak yaradaki bakteri türünden çok, tür sayısı yara iyileşmesi ile daha çok ilişkilidir. Yara iyileşmesindeki gecikme, dört veya daha fazla bakteri türü varlığında, tür sayısı ile doğru orantılıdır⁽¹⁶⁾. Biyofilm çoğunlukla birden çok tür içeren mikroorganizma topluluklarından oluşur, bu nedenle mikrobiyal virülansın sinerjik etkisi sıklıkla yara komplikasyonları ile sonuçlanır^(17,18).

Diyabetik hastalarda regüle olmayan kan glikozu, birçok bakterinin biyofilm üretimine olanak sağlar. Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının, *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ve stafilkokların ekzopolisakkarit (EPS) ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde

arttırdığı gösterilmiştir⁽¹⁹⁻²¹⁾.

Çalışmamızın amacı, diyabetik ayak enfeksiyonu olan hastalarda etken dağılımını ve mikroorganizmaların biyofilm oluşturma oranlarını ortaya koymaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

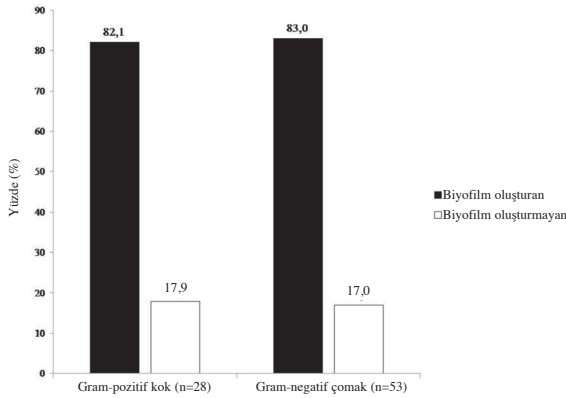
Çalışmada 2013-2015 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen, diyabetik ayak enfeksiyonu olan hastalardan alınan kültür örnekleri değerlendirildi. Kültür için örnekler, yumuşak doku debridmanı ile ve/veya operasyon sırasında kemik dokudan elde edildi. Doku örnekleri %5 koyun kanlı agar (Oxoid) ve McConkey agar (Oxoid) besiyerine ekilerek 37°C'de inkübe edildi. Bakteriler konvansiyonel yöntemler kullanılarak tanımlandı⁽²²⁾.

Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi kullanıldı. Bakteri suşları %0.25 glikoz içeren triptic soy broth (TSB) (Oxoid) sıvı besiyerinde 35.5°C'de bir gece inkübe edildikten sonra, 1/40 oranında %0.25 glikoz içeren TSB sıvı besiyeri ile dilüe edildi. Ardından 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plaklarda her bir kuyucukta 200 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde inoküle edildi. Negatif kontrol kuyucuğu için yalnızca TSB besiyeri kullanıldı. 35.5°C'de 48 saat inkübasyon sonrası kuyucukların içi boşaltıldı ve iki kez nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl %1 kristal viyole eklenerek 15 dakika boyanması için beklendikten sonra içerik boşaltıldı ve iki kez yıkanarak kuyucuklar içinde kalan kristal viyole uzaklaştırıldı. Havada kurutulduktan sonra, etanol-aseton (80/20) ile çözdürüldü⁽²³⁾. 595 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak optik dansitesi ≥ 1 olan izolatların biyofilm oluşturduğu kabul edildi⁽²⁴⁾.

BULGULAR

Çalışmamızda 55 hastadan alınan kemik ve yumuşak doku örneklerinden, 81 etken bakteri izole edildi. On hastada (%18.2) polimikrobiyal enfeksiyon saptandı. İzolatların %34.6'sını Gram-pozitif koklar, %65.4'ünü Gram-negatif basiller oluşturmaktadır. Gram pozitif etkenlerin Gram negatif organizmalara oranı 1:1.9 idi. En sık izole edilen tür *Pseudomonas* spp. (n=16; %19.8) idi.

Seksenbir izolattan 67 (%82.7)'si biyofilm oluşturmuştur. İzole edilen türlerin oranı ve üretilen biyofilm yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Gram-pozitif izolatların 23 (%28.1)'ünde ve Gram-negatif izolatların 44 (%83)'ünde biyofilm varlığı gösterildi (Şekil 1).



Şekil 1. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin biyofilm oluşturma oranları.

Tablo 1. Diyabetik ayak enfeksiyonlarında izole edilen türler ve biyofilm oluşturma oranları.

Mikroorganizma	n (%)*	Biyofilm n (%)**
Gram-pozitif kok	28 (34.5)	23 (82.1)
Koagülaz negatif stafilokok	15 (18.5)	13 (86.6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (9.9)	6 (75)
<i>Enterococcus</i> spp.	4 (4.9)	3 (75)
Grup D streptokok	1 (1.2)	1 (100)
Gram-negatif çomak	53 (65.5)	44 (83.0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	16 (19.8)	15 (93.7)
<i>Escherichia coli</i>	14 (17.3)	9 (64.2)
<i>Acinetobacter</i> spp.	10 (12.3)	8 (80)
<i>Klebsiella</i> spp.	5 (6.2)	4 (80)
<i>Proteus</i> spp.	4 (4.9)	4 (100)
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (2.5)	2 (100)
<i>Serratia</i> spp.	2 (2.5)	2 (100)
Toplam	81*	67 (82.7)**

* Düşey toplama göre; ** Yatay toplama göre

TARTIŞMA

Birçok çalışmada, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa* diyabetik ayak enfeksiyonlarındaki baskın türler olarak bildirilmiştir⁽²⁵⁻²⁷⁾. Çalışmamızda, benzer şekilde *Pseudomonas* spp. en çok izole edilen tür olmuş (n=16; %19.8), bunu koagülaz negatif stafilokoklar (n=15; %18.5) ve *E. coli* (n=14; %17.3) izlemiştir. Sıcak iklime sahip Asya ülkelerindeki çalışmalarla uyumlu olarak, Gram-negatif bakterilerin (özellikle *P. aeruginosa*'nın) Gram-pozitif bakterilere göre daha yaygın olduğunu tespit edilmiştir^(27,28). Diyabetik ayak yaralarında, *Enterobacteriaceae* üyelerinin baskın tür olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir⁽²⁹⁻³¹⁾. Sıcak iklim koşullarına sahip ülkelerde bu durumun, uygun olmayan ayakkabı seçimi, ayakların terlemesi, çorapsız ayakkabı giyilmesi, ayak hijyeninin zayıf olması, dini ritüellerden dolayı ayakların sık sık yıkanması ve yıkandıktan sonra ıslak bırakılması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

Hatipoğlu ve ark.⁽³²⁾ Türkiye'deki diyabetik ayak enfeksiyonlarında 20 yıllık mikrobiyolojik profili ortaya koyan çalışmalarında, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri eşit oranda saptamışlardır. Öte yandan aynı yazarların yakın zamanda yaptıkları çok merkezli bir çalışmada⁽³³⁾, çalışmamızla benzer şekilde, Gram-negatif bakterilerin oranı %60 iken, Gram-pozitif bakterilerin oranı %36 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada *S. aureus* izolatlarının oranı da bulgularımıza yakın değerlerde saptanmış olup, Gram-negatif bakterilerde, özellikle de *E. coli*, *Acinetobacter* spp. ve *Proteus* spp. türlerinde artış izlenmiştir.

Acinetobacter türleri, cerrahi alan ve diğer yara enfeksiyonları da dâhil olmak üzere hastane enfeksiyonlarından sorumlu patojenler olarak tanımlanmıştır. Hatipoğlu ve ark.⁽³³⁾ diyabetik ayak enfeksiyonlarında *Acinetobacter* türlerini %2.84 olarak bildirirken, Ramakant ve ark.⁽²⁷⁾

Hindistan'da bu oranı %3.7 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise, *Acinetobacter* spp. oranı daha yüksek (%12.3) olarak saptanmıştır. Benzer şekilde, Gadepalli ve ark.⁽³⁴⁾ *Acinetobacter* spp. oranlarını %9.3, Karmaker ve ark.⁽³⁵⁾ ise %10 olarak bildirmiştir. Bulgularımız hastanemizdeki *Acinetobacter* türlerinin etken olduğu hastane enfeksiyonları ile uyumlu bulunmuştur. Çünkü hastanemizde 2013-2015 yılları arasında hastane kökenli cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında *Acinetobacter* spp. oranı %14.2 olarak saptanmıştır (yayınlanmamış veri).

Çalışmamızda en sık izole edilen ikinci tür koagülaz negatif stafilocoklar (%18.5) idi. Koagülaz negatif stafilocoklar cilt florasyndan kaynaklanan kontaminan bakteriler olarak düşünülse de, tüm örneklerin derin doku örnekleri olması ve sıklıkla ameliyat odası koşullarında alınması nedeniyle ürediklerinde etken olarak kabul edilmişlerdir. Urbancic-Roven ve ark.⁽³⁶⁾, diyabetik ayak enfeksiyonlarında koagülaz negatif stafilocok oranlarını %20.3 olarak bildirmiştir. Akhi ve ark.⁽³⁷⁾ tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada İran Tebriz'de diyabetik ayak enfeksiyonlarında bakteri izolatlarının %17'sinin koagülaz negatif stafilocok olduğu gösterilmiştir.

Kronik yarada bakterilerin varlığı, tek başına biyofilm oluşumunun göstergesi değildir. Bununla birlikte, kronik yaralarda bulunan mikroorganizmaların çoğunun, özellikle de *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* gibi türlerin, yüksek düzeyde biyofilm ürettikleri bilinmektedir⁽⁴¹⁾. Mottola ve ark.⁽⁴²⁾ 48 saatlik inkübasyon sonrası *Pseudomonas* türlerinde güçlü (%85.7) veya orta (%14.3) düzeyde biyofilm oluşumunu göstermişlerdir. *Staphylococcus* türlerinde ise suşların % 84.4'ünün 72 saatin sonunda orta düzeyde biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Podbielska ve ark.⁽⁴³⁾ diyabetik ayak enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarının % 69'unun ve *S. epidermidis* suşlarının %75'inin biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda, biyofilm oluşumunun en fazla olduğu izolatların *Pseudomonas* bakterileri (%93.7) ve koagülaz negatif stafilocoklar (%86.6) olduğu görülmüştür.

Diyabetik ayak ülserlerinden izole edilen bakterilerin araştırıldığı birçok çalışmada biyofilm oluşumu 24 saatte değerlendirmiştir. Ancak inkübasyon süresinin biyofilm oluşumunu etkilediği, çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir^(42,44). Mottola ve ark.⁽⁴²⁾ stafilocoklar, enterokoklar, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp.'de biyofilm oluşumunun inkübasyon süresi ile arttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, *Corynebacterium* türlerinde gözlenen orta düzeyde biyofilm oluşumu 48 saatlik inkübasyondan sonra artarken, 72 saatin sonunda azalmıştır. Bununla birlikte, *Pseudomonas* türlerinde orta ve yüksek düzeyde biyofilm oluşumu 48 saatlik inkübasyondan sonra artmış ve 72 saatin sonunda sabit kalmıştır. Çalışmamızda, biyofilm oluşumu 48 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmalar ışığında, 48 saat sonrasındaki değerlendirmelerin daha uygun olacağı düşüncesindeyiz.

Hasta verilerinin ve özellikle de risk faktörlerinin bulunmamasının bu çalışmanın temel kısıtlılıklarıdır. Buna karşılık, diyabetik ayak ülserlerinde biyofilm varlığını gösteren az sayıda çalışma vardır. Çalışmamız diyabetik ayak enfeksiyonlarında biyofilm oluşum oranlarının çok yüksek olduğunu göstermiştir. Bu konuda daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu açıktır. Kronik yaralardaki biyofilm yönetimi kronik yara tedavisinin en etkili basamağını oluşturur. Çalışmalarımız, diyabetik ayak enfeksiyon etkenlerinin biyofilm oluşturmasını önlemek veya biyofilmi ortadan kaldırmak için terapötik stratejilerin geliştirilmesi gereksinimini vurgulaması bakımından da önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 2005; 366:1725-35.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67699-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67699-4)
2. Lipsky BA, Berendt AR, Embil J, De Lalla F. Diagnosing and treating diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20(Suppl 1):S56-64.
<https://doi.org/10.1002/dmrr.441>
3. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 2005; 293:217-28.
<https://doi.org/10.1001/jama.293.2.217>
4. Falanga V. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32:88-94.
<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.020>
5. James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16:37-44.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
6. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13:20-6.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
7. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11:1034-43.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>
8. Spormann AM. Physiology of microbes in biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:17-36.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_2
9. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:199-210.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
10. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9:34-9.
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
11. Matz C, Kjelleberg S. Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* 2005; 13:302-7.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
12. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:85-105.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_5
13. Serralta VW, Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM. Lifestyles of bacteria in wounds: Presence of biofilms? *Wounds* 2001; 13:29-34.
14. Bello YM, Falabella AF, Cazzaniga AL, Harrison-Balestra C, Mertz PM. Are biofilms present in human chronic wounds? "Symposium on Advanced Wound Care and Medical Research Forum on Wound Repair" simpozyumu, Las Vegas, NV, ABD, Nisan 2001.
15. Percival S, Bowler P. Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. World Wide Wounds 2004, <http://www.worldwidewounds.com/2004/july/Percival/Community-Interactions-Wounds.html> (Erişim tarihi: Mart 2017)
16. Trengove NJ, Stacey MC, McGeachie DF, Mata S. Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. *J Wound Care* 1996; 5:277-80.
<https://doi.org/10.12968/jowc.1996.5.6.277>
17. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16:2-10.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x>
18. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care* 2008; 17:502-8.
<https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.11.31479>
19. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236:163-73.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>
20. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:49-79.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
21. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3235-8.
22. Winn W Jr, Allen SD, Janda W, Koneman E (ed), Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, ABD, 2006.
23. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998; 28:449-61.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
24. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:4538-45.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001>
25. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:143-9.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkh513>
26. Xu L, McLennan SV, Lo L, et al. Bacterial load predicts healing rate in neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2007; 30:378-80.
<https://doi.org/10.2337/dc06-1383>
27. Ramakant P, Verma AK, Misra R, et al. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? *Diabetologia* 2011; 54:58-64.
<https://doi.org/10.1007/s00125-010-1893-7>
28. Raja NS. Microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Malaysia: a retrospective study of 194 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40:39-44.
29. Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2819-28.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00551-07>
30. Louie TJ, Bartlett JG, Tally FP, Gorbach SL. Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot ulcers. *Ann Intern Med* 1976; 85:461-3.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-85-4-461>
31. Murali TS, Kavitha S, Spoorthi J, et al. Characteristics of microbial drug resistance and its correlates in chronic diabetic foot ulcer infections. *J Med Microbiol* 2014; 63:1377-85.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.076034-0>
32. Hatipoglu M, Mutluoglu M, Uzun G, Karabacak E,

- Turhan V, Lipsky BA.** The microbiologic profile of diabetic foot infections in Turkey: a 20-year systematic review: diabetic foot infections in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33:871-8.
<https://doi.org/10.1007/s10096-014-2047-5>
- 33. Hatipoglu M, Mutluoglu M, Turhan V, et al.** Causative pathogens and antibiotic resistance in diabetic foot infections: A prospective multi-center study. *J Diabetes Complications* 2016; 30:910-6.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.02.013>
- 34. Gadepalli R, Dhawan B, Sreenivas V, Kapil A, Ammini AC, Chaudhry R.** A clinicomicrobiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. *Diabetes Care* 2006; 29:1727-32.
<https://doi.org/10.2337/dc06-0116>
- 35. Karmaker M, Sanyal SK, Sultana M, Hossain MA.** Association of bacteria in diabetic and non-diabetic foot infection - An investigation in patients from Bangladesh. *J Infect Public Health* 2016; 9:267-77.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.011>
- 36. Urbancic-Rovan V, Gubina M.** Infection in superficial diabetic foot ulcers. *Clin Infect Dis* 1997; 25 (Suppl 2):S184-5.
<https://doi.org/10.1086/516184>
- 37. Akhi MT, Ghotaslou R, Asgharzadeh M, et al.** Bacterial etiology and antibiotic susceptibility pattern of diabetic foot infections in Tabriz, Iran. *GMS Hyg Infect Control* 2015; 10:Doc02.
- 38. Banu A, Noorul Hassan MM, Rajkumar J, Srinivasa S.** Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study. *Australas Med J* 2015; 8:280-5.
<https://doi.org/10.4066/AMJ.2015.2422>
- 39. Swarna SR, Madhavan R, Gomathi S, Devaraj, Thamaraiselvi S.** A study of biofilm on diabetic foot ulcer. *Int J Res Pharma Biomed Sci* 2012; 3:1809-14.
- 40. Malik A, Mohammad Z, Ahmad J.** The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes Metab Syndr* 2013; 7:101-7.
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2013.02.006>
- 41. Mottola C, Mendes JJ, Cristino JM, Cavaco-Silva P, Tavares L, Oliveira M.** Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiol (Praha)* 2016; 61:35-43.
<https://doi.org/10.1007/s12223-015-0401-3>
- 42. De la Rosa-Ramos MA, Rodríguez-Cruz M, López-Villegas EO, Castro-Escarpulli G, Guerra-Infante FM.** Conditions that induce biofilm production by *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Pathol* 2015; 44:366-9.
<https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1059923>
- 43. Davis SC, Martinez L, Kirsner R.** The diabetic foot: the importance of biofilms and wound bed preparation. *Curr Diab Rep* 2006; 6:439-45.
<https://doi.org/10.1007/s11892-006-0076-x>
- 44. Podbielska A, Galkowska H, Stelmach E, Mlynarczyk G, Olszewski WL.** Slime production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with diabetic foot ulcers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010; 58:321-4.
<https://doi.org/10.1007/s00005-010-0079-9>

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarında Vankomisine Karşı Azalmış Duyarlılığın Araştırılması

Emine KORKUT TUNÇ, Çiğdem KUZUCU, Barış OTLU

İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Malatya

ÖZ

Amaç: *Staphylococcus aureus*, tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli etkenlerden biridir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'da bakteriler vankomisine karşı çok yüksek minimal inhibitör konsantrasyon değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. "Vankomisin-intermediate" *S. aureus* (VISA)/heterojen VISA (hVISA) suşlarının ise laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Çalışmamızda, Ocak 2008-Ağustos 2013 tarihleri arasında hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş çeşitli örneklerden izole edilip -80°C'de stoklanmış 52 adet MRSA suşu kullanılarak VISA ve hVISA izolatlarının sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu örnekler öncelikle multipleks polimerize zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile *mecA*, *nuc* ve 16S genleri açısından moleküler olarak test edildi. Bu suşlara vankomisin mikrodilüsyon, gradient test, vankomisin agar tarama (BHI-V6) uygulandı. Agar taramada üreyen dokuz suşa makrogradient test ve PAP-AUC yöntemi uygulandı.

Bulgular: Elli iki suşa PZR ile *mecA* gen bölgesi gösterildi. Gradient-test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile tüm suşların vankomisine duyarlı (MİK değeri ≤ 2 µg/ml) olarak tespit edildi. Altı µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHI-V6) tarama testi sonucunda ilk 24 saatte sekiz örnekte, 48. saatte bir örnekte üreme gözlemlendi. Makrogradient testte dokuz suştan beş tanesinin MİK değeri ≥ 8 µg/ml olarak, dört suşın MİK değeri ≤ 8 µg/ml olarak tespit edildi. Popülasyon analiz profili sonucuna göre dokuz suş (%17.30) hVISA olarak değerlendirildi.

Sonuç: Bu sonuçlara göre, vankomisine karşı azalmış duyarlılığa sahip MRSA suşları hastanemizde de mevcuttur. Bu suşların tespiti rutin laboratuvar testleri ile olası olamamaktadır. Bununla birlikte, günümüzde MRSA tedavisinde ilk tercihin glikopeptid grubu antibiyotikler olması nedeniyle bu suşların tespiti tedavi başarısızlığının önüne geçmek için yapılmalıdır.

ABSTRACT

Investigation of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains

Objective: *Staphylococcus aureus* is one of the most important factors that leads to community-acquired and nosocomial infections in the whole world. Vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) bacteria can be detected in routine sensitivity tests because they have very high minimal inhibitory concentration values against vancomycin. Vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA)/heterogenous VISA (hVISA) bacterial strains can not be detected using routine sensitivity tests applied in laboratories. In our study we aimed to search the frequency of VISA and hVISA strains isolated from various samples sent to our hospital microbiology laboratory between January 2008-August 2013. Fifty-two MRSA bacterial strains isolated and stocked in microbiology laboratory of our hospital at -80°C were used to investigate the frequency of VISA and hVISA isolates.

Materials and Methods: These samples were first subjected to molecular tests by multiplex polymerase chain reaction (PCR) method for detecting *mecA*, *nuc* and 16S genes. Vancomycin microdilution, gradient test, vancomycin screen agar (BHI-V6) were applied on these samples. Macrogradient test and PAP-AUC method were run on nine bacterial strains which were reproduced in screen agar.

Results: *mecA* gene zone was displayed in 52 bacterial strains by PCR. All bacterial strains are found to be sensitive to vancomycin (MİK ≤ 2 µg/ml) by using gradient test and broth microdilution method. Bacterial growth was observed within the first 24 (n=8), and 48 hours (n=1) in indicated number of samples in brain heart infusion (BHI-V6) agar screen test which contained 6 µg/ml vancomycin. In macrogradient test MİK values were found to be ≥ 8 µg/ml in 5 strains, and ≤ 8 µg/ml in four bacterial strains. Nine bacterial strains (17.3%) were evaluated to be hVISA according to the population analysis profile results.

Conclusion: According to these results we found that MRSA strains which have decreased sensitivity against vancomycin also present in our hospital. These bacterial strains can not be detected with routine laboratory tests. These bacterial strains should be identified to prevent unsuccessful treatment because nowadays glycopeptide antibiotics are the first choice in the treatment of MRSA.

Anahtar kelimeler: MRSA, vankomisin, VISA/hVISA

Keywords: MRSA, vancomycin, VISA/hVISA

Alındığı tarih: 28.03.2016

Kabul tarihi: 30.03.2017

Yazışma adresi: Emine Korkut Tunç, İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Malatya

e-posta: dreminekorkut@hotmail.com

GİRİŞ

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar vankomisin ve teikoplanin olmak üzere glikopeptid grubu antibiyotiklerdir⁽¹⁾. Ancak ilk olarak 1996 yılında “vancomycin-intermediate” *S. aureus* (VISA) suşları tanımlanmasından kısa bir süre sonra 1997 yılında Hiramatsu ve ark.⁽²⁾, heterojen-VISA (hVISA) olarak adlandırılan yeni bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlardır. “Mu3” olarak adlandırılan ilk hVISA izolatından sonra birçok ülkeden değişen oranlarda olmak üzere hVISA suşları bildirilmiştir. Stafilocoklarda gözlenen bu direnç gelişimini 2002 yılında Michigan’da bir diyaliz hastasında vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) izolatı tanımlanması takip etmiştir⁽²⁻⁴⁾. VRSA da bakteriler vankomisine karşı çok yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. VISA/hVISA suşlarının ise laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHIA), gradient test, makroyöntem gradient test ve PAP AUC (population analysis profile area under the curve, popülasyon analiz profili eğri altında kalan alan) gibi çeşitli tarama yöntemleri VISA/hVISA suşlarının saptanması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. VISA/hVISA suşlarının tanımlanmasında popülasyon analiz profili (PAP AUC) altın standart yöntemdir⁽⁵⁻⁹⁾.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Ocak 2008-Ağustos 2013 tarihleri arasında, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na gönderilmiş çeşitli örneklerden izole edilip -80°C’de stoklanmış 52 adet MRSA suşu kullanıldı. Bu örnekler öncelikle *mecA*, *nuc* ve 16S genleri açısından moleküler olarak test edildi. *mecA*, *nuc* ve 16S genlerinin her üçü için pozitif olan suşlar metisilin dirençli *S. aureus* kabul edilerek

bu suşlara vankomisin agar tarama, vankomisin mikrodilüsyon ve gradient testleri uygulandı. Vankomisin agar tarama da üreyen *S. aureus* suşlarına VISA ve h-VISA yönünden makro gradient test ve popülasyon analiz profili yapıldı.

Moleküler Yöntem

QIASymphony (Almanya) cihazında otomatik DNA ekstraksiyonu yapıldı. Mutipleks polimerize zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile (*mecA*-1, *mecA*-2, *nuc*1, *nuc*2, LAB16SF ve LAB16SR primerleri kullanılarak) metisilin direnci, koagülaz genleri ve 16S bakteriyel DNA varlığı gösterildi.

Buyyon Mikrodilüsyon

Mikroplağın birden 12’ye kadar olan yatay kuyucuklarına 50’şer µl Mueller Hinton buyyon eklendi, 512 µg/ml konsantrasyonda vankomisin (Liofilchem, Italya) 50 µl alınarak ilk 11 kuyucukta seri dilüsyon yapıldı. On ikinci kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanıldı ve antibiyotik eklenmedi. On ml Mueller Hinton broth besiyerine 50 µl 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu eklendi. Kısa bir süre vorteksledikten sonra bu süspansiyondan 50’şer µl alınıp 12 kuyucuğa da ilave edildi. Mikroplağın üzeri steril bir plakla kapatıldıktan sonra 35°C’de 24 saat inkübe edildi. Her bir suşa ait üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirildi. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine⁽⁹⁾ göre vankomisin MİK değeri okundu. *S. aureus* için ≤2 µg/ml olanlar duyarlı, 4-8 µg/ml olanlar orta derecede duyarlı, ≥16 µg/ml olanlar da dirençli kabul edildi⁽⁹⁾. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

Gradient test

Kanlı agarda bir gece bekletilmiş kültürden üre-

yen taze kolonilerden alınarak 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu hazırlandı. Mueller Hinton agar yüzeyine yayıldı. Vankomisin gradient test stripleri (Liofilchem, İtalya) yerleştirildikten sonra 35°C’de 24 saat inkübe edildi. MİK değerleri belirlendi ve CLSI’nın önerdiği MİK değerleriyle karşılaştırıldı⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Vankomisin Agar Tarama

Bu yöntem, ABD Hastalıkların Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) önerileri doğrultusunda 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon (BHI-V6 Oxoid) besiyerinde yapıldı. Bunun için 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) agar hazırlandı. Kanlı agarda bir gece bekletilmiş kültürden üreyen taze kolonilerden alınarak 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyondan 10 µl alınıp 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agara ekildi, 35°C’de 24 ve 48 saat inkübe edildi. Eğer 24 saat sonra gözle görünür üreme varsa izolatlar potansiyel VISA olarak değerlendirildi. Eğer 48 saat içinde sayılabilir (1-30 koloni oluşturan ünite, CFU) üreme görülürse izolat olası hVISA olarak değerlendirildi. Kırk sekiz saat sonunda üreme görülmezse izolat vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi. Kalite kontrol suşları olarak kendi hastanemizde izole edilen ve VanA içerdiği moleküler olarak tespit edilen vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) ile vankomisine duyarlı köken olan *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

Makro Gradient Test Metodu

VISA tarama yöntemi olarak makro gradient test yöntemi kullanıldı. İki McFarland bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak 90 mm çapında BHI agar plaklarına yayıldı. Yaklaşık 10 dakika biyogüvenlik kabininde besiyeri yüzeyi kuruyuncaya

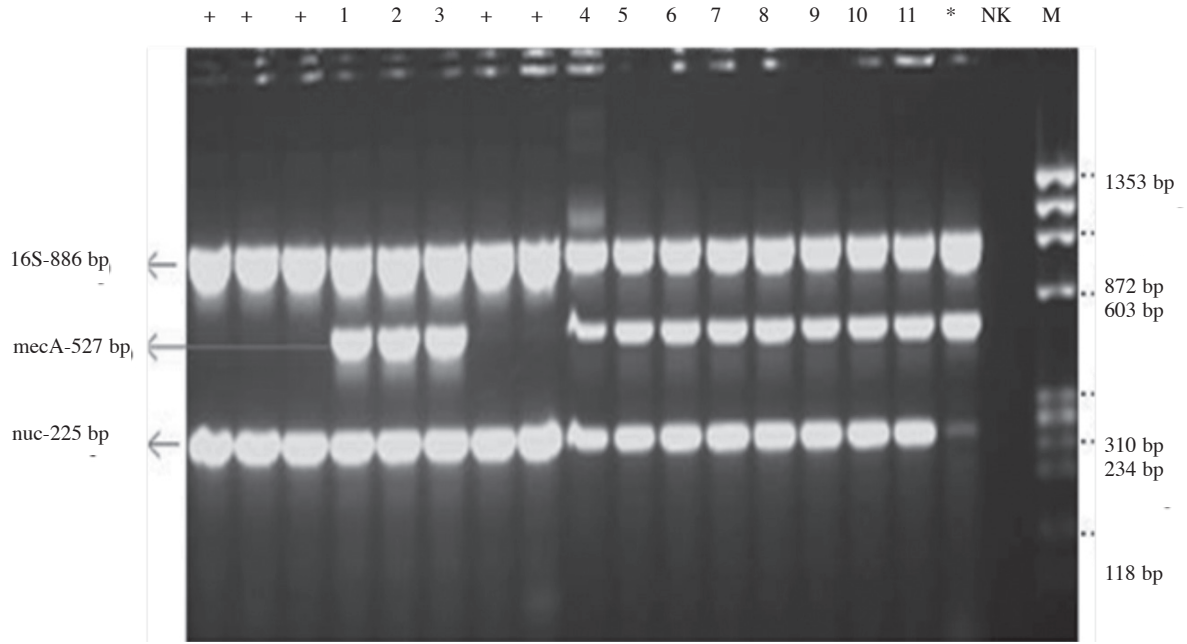
kadar beklendi ve gradient test stripleri yerleştirildi. Plaklar 48 saat 35°C’de inkübe edildi ve MİK değeri 8 µg/ml ve üzeri olan suşlar VISA/hVISA kabul edildi⁽¹³⁾.

Popülasyon Analiz Profili

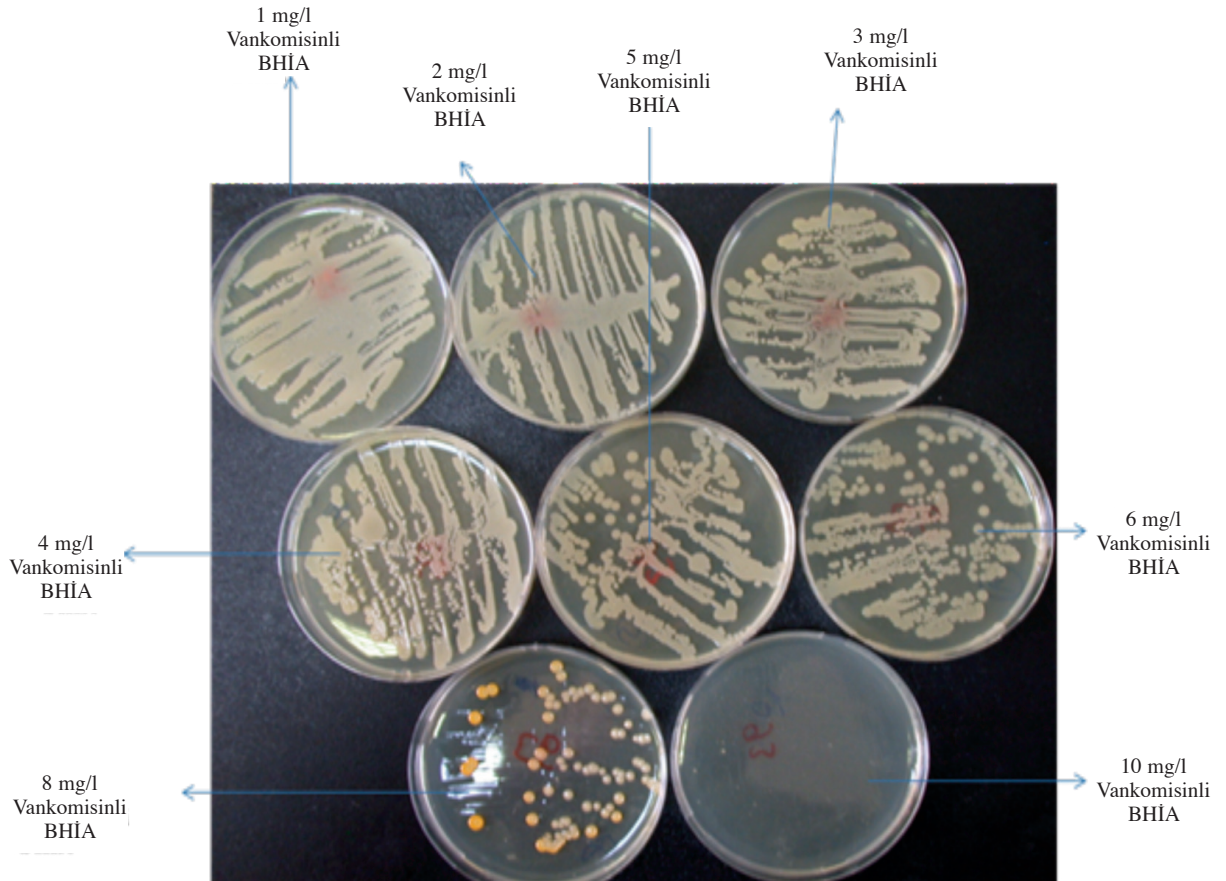
Daha önceden Wootton ve ark.’nın⁽¹³⁾ tanımladığı şekilde yapılan bu yöntem, VISA ve h-VISA suşlarının belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmiştir. PAP-AUC yöntemi, BHI-V6 besiyerinde üreyen şüpheli hVISA/VISA izolatlarının duyarlılık düzeylerini doğrulamak amacıyla uygulandı. Şüpheli izolatların 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış süspansiyonlarından ve 10 kat seri dilusyonlarından 50’şer µl, sırasıyla 1, 2, 4, 5, 6, 8 ve 10 µg/ml vankomisin içeren BHI agar besiyeri yüzeylerine yayıldı. Bakteriler, 35°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra, koloni sayımları gerçekleştirildi. Plaklarda her bir konsantrasyonda üreyen kolonilerin sayıları y eksenine, antibiyotik konsantrasyonları ise x eksenine yerleştirilerek grafikleri çizildi. Her bir suş için eğri altındaki alan (AUC) Microsoft Excel (ABD) programıyla hesaplandı. Elde edilen değer, standart hVISA suşu olan Mu3 için hesaplanan AUC değerine bölünerek bir oran elde edildi. Bu oran ≤ 0.90 ise vankomisine duyarlı stafilocok, $0.90-1.3$ ise hVISA, ≥ 1.3 ise VISA olarak kabul edildi^(14,15).

BULGULAR

Çalışmaya alınan 52 MRSA suşunun 21’i yaraabse, 15’i kan, dokuzu trakeal aspirat-balgam, üçü dren, ikisi parasentez ve ikisi diğer örnekler şeklindedir. Bu suşların servislere göre dağılımı 13’ü cerrahi servis-yoğun bakım, sekizi organ nakli servis-yoğun bakım, sekizi dâhili servis-yoğun bakım, altısı ortopedi servisi, altısı reanimasyon servisi, üçü yanık ünitesi, ikisi enfeksiyon servisi ve altısı diğer servisler şeklindedir.



Resim 1. 1-11. örneğin PZR görüntüleri.



Resim 2. Kırk sekiz no'lu örneğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 mg/l vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agarda 35°C'de 48 saat inkübasyon sonucu üreme görüntüleri.

PZR Sonuçları: Elli iki suşta sırasıyla 886 bp bölgede bir bant, 527 bp'lik bölgede bir bant ve 225 bp'lik bölgede bir bant gözlenmesiyle bu suşlar 16S (+), *mecA* (+), *nuc* (+) ve bu suşlar MRSA olarak değerlendirildi. PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Resim 1'de gösterilmiştir.

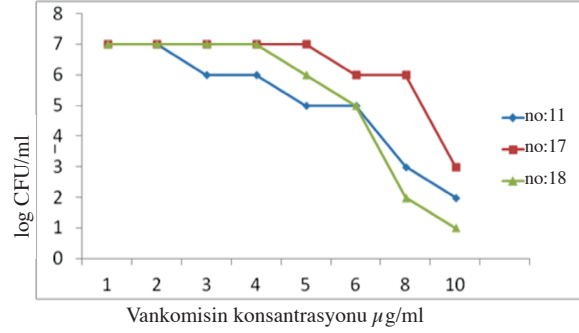
Gradient test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemi sonuçları: Gradient test ve buyyon mikrodilüsyon sonuçları benzer şekilde idi. Tüm suşlar her iki yöntem ile vankomisine duyarlı olarak tespit edildi. Vankomisin MİK değerlerinde yıllar içinde bir artış (MIC creep) olmadığı görüldü.

Agar tarama sonuçları: Elli iki tane *mecA* (+) *S. aureus* suşa 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHI-V6) tarama testi yapıldı. İlk 24 saatte sekiz örnekte (11., 17., 18., 24., 36., 37., 48., 49.), 48. saatte ilave bir (43. Örnekte) örnekte daha üreyerek toplamda dokuz örnekte 6 µg/ml vankomisinli agar taramada üreme gözlemlendi.

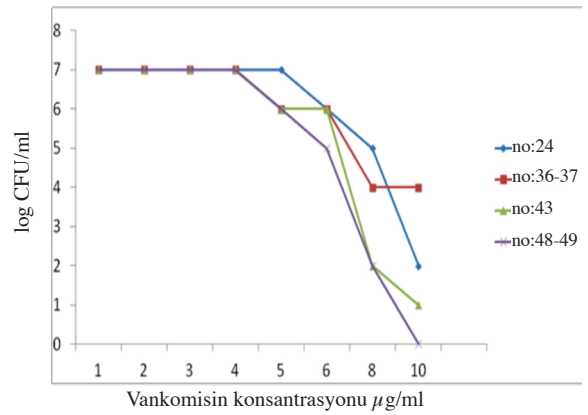
Makro Gradient test sonuçları: 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon tarama agar-da üreyen dokuz suşa makro gradient test ve popülasyon analiz profili uygulandı. Makro gradient testte bu dokuz suştan beş tanesinin MİK değeri ≥8 µg/ml olarak değerlendirildi. Dört suşun MİK değeri ≤8 µg/ml olarak değerlendirildi.

PAP-AUC sonuçları: 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon tarama agarda üreyen dokuz suşa uygulanan popülasyon analiz profili sonucuna göre bu bakterilerin eğri altındaki alanlarının Mu3 suşununkine oranı 11. suş için 1.05; 17. suş için 1.29; 18. suş için 1.1; 24. suş için 1.26; 36. suş için 1.2; 37. suş için 1.2; 43. suş için 1.15; 48. suş için 1.1; 49. suş için 1.1 olarak belirlendi. Bu suşların eğri altında kalan alanları 0.90-1.3 aralığında idi ve bu dokuz suş (%17.30) hVISA olarak değerlendirildi.

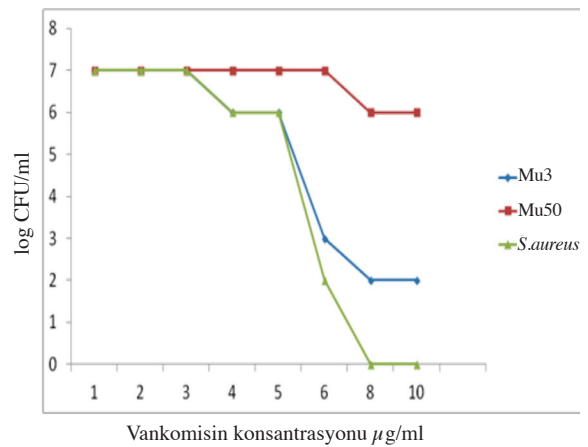
Popülasyon analizi yapılan bakterilerden 48. örneğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 mg/ml vankomisin içeren BHİA'daki üreme görüntüsü Resim 2'de gösterilmiştir. Agar taramada üreyen dokuz suşun PAP-AUC alan grafikleri Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 1. 11, 17 ve 18 numaralı suşların PAP-AUC grafikleri.



Şekil 2. 24, 36, 37, 43, 48, 49 numaralı suşların PAP-AUC grafiği.



Şekil 3. Mu3 (hVISA), Mu50 (VISA), standart *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) suşlarına ait PAP-AUC grafiği.

TARTIŞMA

Stafilokoklarda vankomisine karşı azalmış duyarlılığın saptanmasında otomatize sistemler, agar dilüsyon, buyyon dilüsyon, popülasyon analizi profili ve makroyöntem gradient test gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır⁽¹³⁾. CDC VISA taraması için 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar kullanılması önermektedir. Vankomisinli tarama besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllükleri yüksek olmamasına rağmen, kolay yapılabilirlikleri, hızlı ve ucuz olmaları nedeniyle laboratuvarlarda kullanılmaya devam edilmektedir⁽¹³⁾.

hVISA suşları ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Hiramatsu ve ark.⁽¹⁴⁾ Japonya'da 203 hastaneden, 1149 klinik MRSA izolatında VRSA prevalansına yönelik çalışmalarında popülasyon analiziyle, 7 üniversite hastanesinde hVISA prevalansını %9.3, bir üniversite hastanesinde %20, üniversite olmayan hastanelerde ve kliniklerde ise %1.3 olarak bulmuşlardır.

Türkiye'de ilk hVISA suşu Gülay ve ark.⁽¹⁶⁾ tarafından 1998 yılında rapor edilmiştir. Gülay ve ark.⁽¹⁶⁾ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde klinik örneklerden izole ettikleri 95 MRSA suşunda vankomisin direncini 4-8 µg/ml vankomisin içeren BHIA'da araştırmışlardır. Agar taramada üreyen beş suşa (%5.3) mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin çalışmışlar ve bu suşlarda vankomisine azalmış duyarlılık saptamışlardır (MİK: 8 µg/ml). Mirza ve ark.'nın⁽¹¹⁾ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta grubundan izole edilen 94 MRSA ile yaptıkları çalışmada, çalışmaya dâhil edilen MRSA izolatlarında vankomisin MİK değerlerinde yıllar içinde bir artış olmadığı (MIC creep), hem mikrodilüsyon hem de gradient test yöntemi ile izolatların tamamının vankomisine ve daptomisine duyarlı bulunduğu gösterilmiştir. PAP-AUC yöntemi ile 20 (%21) hVISA izolatı saptanmış,

PAP-AUC yöntemi ile makrogradient test yöntem sonuçları karşılaştırıldığında makrogradient test yöntemin duyarlılığı %71.4, özgüllüğü ise %91.4 olarak tespit edilmiştir. hVISA izolatlarının %75'inde vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanmış, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolatların ise %53.6'sını hVISA olarak tespit etmişlerdir.

Sancak ve ark.⁽¹²⁾ 2005 yılında 256 MRSA suşunu 4 µg/ml vankomisin içeren BHIA'da taramışlar ve 145 suşun 48. saatte ürediğini saptamışlardır. Bu suşlara yapılan makrogradient test sonucu 46 (%17.9) suş hVISA olarak tespit edilmiş ve bu 46 suş popülasyon analiz profili ile doğrulanmıştır. Sancak ve ark.'nın⁽¹⁷⁾, yedi farklı üniversite hastanesinden 2007-2010 yılları arasında yaptığı başka bir çalışmada, 175 tane MRSA kan örneğinde PAP-AUC ile hVISA oranını %13.7 (24/175) bulmuşlardır. Vankomisin MİK değeri 71 (%40.6) suşta 2 µg/ml bulunmuş. hVISA oranları MİK değeri ≥1 µg/ml olan izolatlarda daha yüksek oranda saptanmış, makrogradient test yönteminin duyarlılığı %58.3 özgüllüğü %92.1 olarak bulunmuştur. Mikrodilüsyon ve gradient test ile elde edilen MİK değerleri arasındaki yüzde uyumu hem vankomisin hem de daptomisin için yüksek bulunmuştur. MRSA izolatlarının tümünün daptomisine duyarlı olduğu saptanmış ve MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotiklere alternatif bir ilaç olabileceği vurgulanmıştır. hVISA tanımlanmasında tercih edilmesi gereken yöntemin PAP-AUC olduğu, ancak uygulanması pratik olmadığından, daha hızlı ve doğru sonuç veren yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim olduğu vurgulanmıştır.

Çalışmamızda, 52 tane *mecA* pozitif *S. aureus* suşuna 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA taraması yapılmış suşlardan sekiz tanesi 24. saatte, bir tanesi 48. saatte agar tarama besiyerinde üreyerek toplamda dokuz (%17.3) suş agar tarama ile hVISA şüpheli olarak tespit edilmiştir. Hem

mikrodilüsyon hem de gradient test yöntemi ile izolatların tamamı vankomisine duyarlı bulunmuştur. Altı tane suşun vankomisin MİK değeri 1 µg/ml olarak tespit edilmiş ve bu suşların beş tanesi PAP-AUC ile hVISA olarak tespit edilmiştir. Tarama pozitif olan suşlar ile yapılan makrogradient test yöntemi ile beş tane suşun vankomisin MİK değeri ≥ 8 µg/ml hVISA, dört tane suşun vankomisin MİK değeri ≤ 8 µg/ml olarak bulunmuş ve bu suşlar vankomisine duyarlı olarak tespit edilmiştir. Agar tarama pozitif olan dokuz suşa yapılan PAP-AUC sonuçlarına göre dokuz suşta (%17.3) hVISA olarak tespit edilmiştir.

Feng ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ 2013'te toplam 456 MRSA izolatı ile yaptıkları çalışmada, 105 izolat (%23) 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA da üremiş ve bu suşlara yapılan PAP-AUC'de 21 suş (%4.6) hVISA olarak doğrulanmıştır. Riederer ve ark.'nın⁽¹⁹⁾ 2011'de kan kültüründen izole edilen 457 MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada, makrogradient test metodu ile yedi izolatı VISA (%1.4), 33 izolatı hVISA olarak tespit etmişlerdir. Makrogradient test metodunun sensitivitesini %75, spesifitesini %89 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, hVISA/VISA izolatlarını tespit etmede 3 mg/L ve 4 mg/L vankomisin içeren BHIA tarama besiyerlerinin spesifite ve sensitivitelelerini karşılaştırmışlar BHIA-4 için sensitivite %100, spesifite %94.6, BHIA-3 için sensitivite %27.5, spesifite %100 olarak bulmuşlardır.

Walsh ve ark.⁽²⁰⁾, agar dilüsyon, buyyon mikrodilüsyon, gradient test (0.5 ve 2.0 McFarland inokulumlu), vankomisin agar tarama ve modifiye vankomisin agar tarama yöntemleri ve basitleştirilmiş popülasyon analizini içeren yedi farklı yöntemle 284 MRSA ve vankomisine duyarlılığı azalmış 45 stafilokok izolatında yöntemlerin, duyarlılık ve özgülüğünü karşılaştırmışlardır. Standart PAP-AUC yöntemiyle karşılaştırdıkları çalışmalarında, 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar tarama yönteminin duyarlılığını %22, özgülüğünü %97; 5 µg/ml vankomisin

içeren Mueller Hinton agar tarama yönteminin duyarlılığını %20, özgülüğünü %99; basitleştirilmiş popülasyon analizi yönteminin duyarlılığını %71, özgülüğünü %88; 0.5 McFarland inokulumla yaptıkları gradient test için duyarlılığı %82 özgülüğü %93; 2.0 McFarland inokulumla yaptıkları gradient test için duyarlılığı %96 ve özgülüğü %97 olarak bulmuşlardır.

Vankomisin, MRSA enfeksiyonlarının parenteral tedavisinde primer seçeneklerden biridir. Ancak vankomisin bakterisidal aktivitesinin yavaş oluşu, dirençli suşların ortaya çıkışı ve "MİK creep" fenomeni nedeniyle, etkinliği ile ilgili kaygılar olmaktadır. Vankomisine azalmış duyarlılığı olan MRSA enfeksiyonlarının geliştiği hastaların değerlendirildiği bir derlemede hastaların osteomyelit, derin doku enfeksiyonu ile ilişkili bakteriyemi, endokardit gibi ciddi enfeksiyonlarının bulunduğu, bu hastalarda diyabet, malignite, böbrek yetmezliği, immun-supresyon ve cerrahi operasyon geçirilmesinin risk faktörü olduğu ve tüm hastaların VISA gelişmeden önce vankomisinle tedavi edildiği bu hastaların %76'sında tedavi başarısızlığı olduğu bildirilmiştir⁽²¹⁾. Çalışmamızda da, hVISA olarak tanımlanan suşların izole edildiği hastalar hastanemizin bilgisayar veri tabanından geriye yönelik incelendiğinde elde edilen verilere göre hastaların uzun süreli glikopeptid kullanım öyküsü olduğu ve bazılarının büyük cerrahi işlemlere maruz kaldıkları tespit edilmiştir.

VanA geni olmadan genetik mutasyonların olması ve hücre fizyolojisindeki değişiklikler sonucu vankomisinin hedefine ulaşmasını engelleyecek şekilde hücre duvarının kalınlaşması VISA suşlarının gelişmesine neden olmaktadır⁽²²⁾. *S. aureus*'ta vankomisin direncinin gelişmesinde hücre duvar kalınlaşmasının yaygın olduğunun gösterildiği çok merkezli bir çalışmada, 16 klinik VRSA izolatı seri olarak antibiyotiksiz ortama pasajlanmış ve pasaj sonrası yapılan çalışmalarda, vankomisin MİK değerlerinin düş-

tüğü (MİK<4 mg/L) saptanmıştır. Bununla birlikte, populasyon analiziyle yapılan çalışmada, bir suş hariç 15 suşta hâlâ vankomisine dirençli alt popülasyonların bulunduğu gösterilmiştir⁽²²⁾.

Glikopeptid grubu antibiyotiklerin yalancı duyarlı olarak saptanmaları, glikopeptidlere azalmış duyarlılığı bulunan suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Özellikle vankomisin tedavisine yanıt vermeyen veya ilk başta düzelme gösterirken ve tedavi devam ederken aniden kötüleşen hastalarda, VISA ve h-VISA olasılığı göz önünde bulundurulmalı ve hastanelerde glikopeptid kullanımının yaygın olduğu ülkemizde bunların prevalansının tespit edilmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Sancak B.** MRSA direnç mekanizmaları: Dünyada ve Türkiye’de epidemiyolojisi. *ANKEM Derg* 2012; 26(Ek 2):E38-47.
2. **Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:135-6.
<https://doi.org/10.1093/jac/40.1.135>
3. **Öncül O.** Vankomisin ve teikoplanin hikayesi. *ANKEM Derg* 2010; 24(Ek2):E101-9.
4. **Hota B, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK.** Interventional evaluation of environmental contamination by vancomycin-resistant enterococci: failure of personnel, product, or procedure? *J Hosp Infect* 2009; 71:1 23-31.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.10.030>
5. **Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, et al.** The Staphylococci. In: Jawetz, Melnick and Adelberg’s Medical Microbiology. 24th Ed. New York: McGraw-Hill, 2007;224-32.
6. **Koneman EW, Allen SD, William MJ, Schereckenberger PC, Winn WC.** Gram-positive cocci, Part I: Staphylococci and related gram-positive cocci. Winn WC Jr et al (editors). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2006;623-71.
7. **Brooks GF.** Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri Editörü: Osman Şadi Yenen. Nobel Tıp Kitabevleri 2010; 224-32.
8. **Kuşçu F, Öztürk DB, Gürbüz Y, Tütüncü EE, Şencan İ, Gül S.** Metisiline dirençli stafilokoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:248-57.
9. **J van Hal S, Wehrhahn MC, Barbogiannakos T, et al.** Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1489-94.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02302-10>
10. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
11. **Mirza HC.** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta grubundan izole edilen MRSA suşlarından vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus* (VISA) ve heterojen VISA sıklığının araştırılması. 2.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, Antalya, 2013.
12. **Sancak B, Ercis S, Menemenlioğlu D, Çolakoğlu S, Haşcelik G.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:519-23.
<https://doi.org/10.1093/jac/dki272>
13. **Aktaş E, Mengeloğlu FZ, Külah C, Beğendik Cömert F.** Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:339-41.
14. **Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al.** Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350(9092):1670-73.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07324-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07324-8)
15. **Willke A, Sayan M, Meriç M, Mutlu B.** Kan kültürlerinde üreyen stafilokoklarda metisilin direncinin gerçek zamanlı PCR ile erken tanısı. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46:671-5.
16. **Gülçay Z, Atay T, Yuluğ N.** *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. *ANKEM Derg* 1998; 12:101.
17. **Sancak B, Yağcı S.** MRSA kan izolatlarında vankomisin ile daptomisin duyarlılığının araştırılması ve VISA-hVISA taranması. 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, Antalya, 2011.
18. **Feng NN.** The incidence and risk factors for heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2013; 52:318-22.
19. **Riederer K, Shemes S, Chase P, Musta A, Mar A, Khatib R.** Detection of intermediately vancomycin susceptible and heterogeneous *Staphylococcus aureus* isolates: Comparison of Etest and agar screening methods. *J Clin Microbiol* 2011; 49:2147-50.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01435-10>
20. **Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, et al.** Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2439-44.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2439-2444.2001>
21. **Howden BP, Ward PB, Charles PGP, Korman TM et al.** Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis* 2004; 38(4):521-8.
<https://doi.org/10.1086/381202>
22. **Hiramatsu K.** Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1(3):147-55.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00091-3)

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.
- Yazarların sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yayımlanması istenen metnin dayandığı çalışma, daha önce bir yerde yayımlanmamış ya da yayımlamak üzere teslim edilmiş veya kabul edilmiş olmamalıdır. Özet biçiminde yayımlanmış bir ön bildirinin bitmiş biçimine yer verilebilir.
- Dergiye gönderilen yazılar, ilk olarak dergi standartları açısından incelenir. Derginin istediği forma uymayan yazılar, daha ileri bir incelemeye gerek görülmeksizin yazarlarına iade edilir. Bu nedenle gereksiz yere zaman ve emek kaybına yol açılmaması için, yazı sahipleri dergi kurallarını dikkatli incelemek zorundadır.
- Dergi kurallarına uygunluğuna karar verilen yazılar 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 incelemeden geçen yazılar, Yayın Kurulu tarafından tekrar değerlendirilir ve basılacağı yer ve sayı kararlaştırılır.
- Danışma ve Yayın Kurulları; düzeltme, kontrol ve dizgi aşamasında yayıncı, yazılarda düzeltme yapmak, biçiminde değişiklikler istemek ve yazarları bilgilendirerek kısaltma yapmak yetkisine sahiptir. Yazarlardan istenen değişiklik ve düzeltmeler yapılana kadar, söz konusu yazılar yayın 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 bildirimi 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 uyusmalıdır
- 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^(1,5,6).....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 5th 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. 2nd 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.

