

Cilt / Volume 47
Sayı / Number 2
Haziran / June 2017

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516



Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✓ HIV'in Güncel Tanı Algoritmi ve Gelişen Korunma Yöntemleri
- ✓ Suriye İç Savaşı Sonrası Türkiye'nin Güneşdoğu Anadolu Bölgesi'nde Kistik Ekinokokkozis'in Moleküler Epidemiyolojisi
- ✓ Klinik Örneklerden ve Havadan İzole Edilen Küf Mantarlarının In Vitro Virülans Faktörlerinin ve *Galleria mellonella* Larva Ölüm Hızlarının Karşılaştırılması
- ✓ Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Saptanmasında Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Kullanımı

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY



Cilt / Volume 47

Sayı / Number 2

Haziran / June 2017



TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 47 Sayı / Number 2 Haziran / June 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

Mehmet Baysallar (Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi)

Sevgi Ergin (İstanbul Üniversitesi)

Dilara Ögünç (Akdeniz Üniversitesi)

Asuman Birinci (Ondokuzmayıs Üniversitesi)

Duygu Fındık (Selçuk Üniversitesi)

Tuncer Özekinci (Dicle Üniversitesi)

Zeynep Taş Cengiz (Yüzüncü Yıl Üniversitesi)

Meral Karaman (Dokuz Eylül Üniversitesi)

Murat Sayan (Kocaeli Üniversitesi)

Serpil Değerli (Cumhuriyet Üniversitesi)

Tekin Karşılığil (Gaziantep Üniversitesi)

A.Arzu Sayiner (Dokuz Eylül Üniversitesi)

Gülferm Ece (Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi)

Canan Külâh (Bülent Ecevit Üniversitesi)

Ayşin Zeytinoglu (Ege Üniversitesi)

Yayımlanan sayıya ait değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

“TÜBİTAK ULAKBİM Tıp Veri Tabanı” ve “Türkiye Atıf Dizini” tarafından indekslenmektedir.

Sahibi / Owner

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Adına

On Behalf of The Turkish Society of Microbiology

Prof. Dr. Zeynep Çiğdem Kayacan

Yazışma Adresi / Correspondence Adres

Prof. Dr. Çağrı Ergin

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası
Kınıklı / Denizli

Tel: 0258 296 24 91

e-posta: tmcdditor@gmail.com

www.tmc-online.org

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

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Her Hakkı Mahfuzdur.

Turkish Society of Microbiology, All Rights Reserved

Copyright © 1993

Yayın Türü: Yerel Süreli

Basım Yeri / Printed by



Logos Yayıncılık Tic. A.Ş.

Yıldız Posta Cad. Sinan Ap. No. 36 K.12 D.66-67
34349 Gayrettepe-İstanbul

Tel: 0212 288 50 22 - 288 05 41 **Faks:** 0212 211 61 85

e-posta: logos@logos.com.tr

www.logos.com.tr

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



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

DERLEME / REVIEW

- **HIV'in Güncel Tanı Algoritmi ve Gelişen Korunma Yöntemleri**
Current Diagnostic Algorithm of HIV and Emerging Prevention Methods
Ferhat Gürkan ASLAN, Mustafa ALTINDIŞ **47-60**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS

- **Suriye iç Savaş Sonrası Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Kistik Ekinokokkozis'in Moleküler Epidemiyolojisi**
Molecular Epidemiology of Cystic Echinococcosis in Southeast Anatolian Region of Turkey After Syrian Civil War
Fadime EROĞLU, Mehmet DOKUR, Erdal UYSAL, Mehmet SÖKÜCÜ, Yüksel ULU **61-66**
- **Klinik Örneklerden ve Havadan İzole Edilen Küf Mantarlarının İn Vitro Virülans Faktörlerinin ve *Galleria mellonella* Larva Ölüm Hızlarının Karşılaştırılması**
*Comparative Evaluation of in Vitro Virulence of Mould Isolates from Clinical Cases and from Air Samples and Their Mortality Rates in *Galleria mellonella* Larvae*
Zemfira ALİYEVA, Hatice ERDEM, Ahmet Kamil KARAKUŞ, Ayşe KALKANCI **67-77**
- **Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Saptanmasında Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Kullanımı**
*Use of Carbapenemase Inactivation Test in the Detection of Carbapenemase Production Among The Isolates of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae**
Tayfun DEMİRAY, Özlem AYDEMİR, Ümit KILIÇ, Kerem YILMAZ, Mehmet KÖROĞLU, Mustafa ALTINDIŞ **78-82**

• <i>Staphylococcus aureus</i> Suşlarında Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direncinin Fenotipik Yöntemlerle Belirlenmesi ve Kinupristin/Dalfopristinin İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması <i>Determination f Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Resistance in Staphylococcus aureus Strains by Phenotypical Methods and Investigation of In Vitro Activity of Quinupristin/Dalfopristin</i> Muharrem ÇİÇEK, Özlem TUNCER, Banu SANCAK, Burçin ŞENER	83-88
• Kan Kültüründe Koagülaz Negatif Stafilokok Üreyen ve CDC Kriterlerine Göre Etken/Kontaminant Ayrımı Yapılan Hastaların Demografik ve Bazı Klinik Özelliklerinin Karşılaştırılması <i>Comparison of Demographic and Some Clinical Features of Patients Whose Blood Cultures Revealed Growth of Coagulase Negative Staphylococci and Differentiation Between Infectious Agent and Contaminant was Performed According to the CDC Criteria</i> Yasemin Derya GÜLSEREN, Ayşe Esra KARAKOÇ, Gamze TÜRKOĞLU, Cemal BULUT	89-93
 <u>OLGU SUNUMU / CASE REPORT</u>	
• <i>Gemella haemolysans</i>'ın Etken Olduğu Bir Ampiyem Olgusu <i>Current Diagnostic Algorithm of HIV and Emerging Prevention Methods</i> Ferhat Gürkan ASLAN, Mustafa ALTINDIŞ	94-96
YAZARLARA BİLGİ	V-VI

HIV'in Güncel Tanı Algoritmi ve Gelişen Korunma Yöntemleri

Ferhat Gürkan ASLAN, Mustafa ALTINDIŞ

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Sakarya

ÖZ

İnsan immün yetmezlik virusu (Human Immunodeficiency Virus/HIV) edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromunun (Acquired Immunodeficiency Syndrome/AIDS) etiyolojik ajanıdır. İlk olarak 1981 yılında tanımlanmış olan AIDS son 30 yılda yaptığı salgınla 35 milyondan fazla ölüme neden olmuştur. HIV/AIDS'in önlenmesi erken tanı, tedavinin başlatılması ve enfekte olmuş kişinin düzenli olarak plazma viral yükü açısından izlenmesini gerektirmektedir. Bunlara ek olarak, doğru ve duyarlı testlerin kullanılması ile belirlenecek insidans bilgileri halk sağlığı çalışmalarında HIV'in önlenmesi çabalarına yardımcı olacaktır. Bu nedenle erken tanıya olanak sağlayacak daha uygun hasta başı test teknolojilerinin geliştirilmesi, HIV viral yükünün ölçülmesi, CD4 (+) hücre sayılarının belirlenmesi ve sonuçta AIDS hastalığının olmadığı yeni nesiller oluşturmak için viral bulaşın önlenmesi önemlidir.

Anahtar kelimeler: AIDS, HIV enfeksiyonu, tanı algoritmi

ABSTRACT

Current Diagnostic Algorithm of HIV and Emerging Prevention Methods

Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the etiologic agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). AIDS, first described in 1981, caused more than 35 million deaths within the last 30 years. Prevention of HIV/AIDS requires early diagnosis, initiation of treatment, and regular monitoring of the infected person in terms of plasma viral load. In addition, the information about the incidence which will be determined by the use of accurate and sensitive tests will help efforts to prevent HIV in public health studies. For this reason, the development of more appropriate point of care bedside test technologies that will allow early diagnosis of HIV, measurement of viral load, and determination of CD4 (+) cell numbers are important. Consequently, it is important to prevent viral transmission in order to have new generations without AIDS disease.

Keywords: AIDS, diagnostic algorithm, HIV infection

GİRİŞ

İnsan immün yetmezlik virüsü (Human immunodeficiency virus/HIV) sahip olduğu reverse transkriptaz aktivitesi ve proviral DNA dizisi nedeniyle Retroviridae ailesi içerisinde Lentivirus cinsinde sınıflandırılmıştır. Lipid zarf ile çevrili pozitif polariteli RNA'ya sahip olan viral partikül yaklaşık 110 nm çapındadır. Enfeksiyöz partiküller (virionlar) birbirinin aynısı olan, iki adet, 9-10 kb uzunluğunda, tek zincirli RNA içerirler^(1,2). Edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromu (Acquired Immunodeficiency Syndrome/AIDS) HIV'in neden olduğu insan immün sistem hastalığıdır ve enfeksiyon-

ları önleme görevi olan immün sistemin CD4 (+) T lenfositlerini yok ederek immün sistem hücrelerinin işlevlerini bozar^(1,3).

Günümüzün en büyük pandemilerinden olan AIDS dünya genelinde benzeri görülmemiş boyutlara ulaşabilen en önemli sağlık sorunlarından birisidir⁽³⁾. Global HIV/AIDS pandemisi bugüne kadar 39 milyon ölüme neden olmuştur ve HIV/AIDS ile yaşayan insanların sayısı giderek artmaktadır⁽⁴⁾. Bu rakam 2015 yılında 38.8 milyona ulaşmıştır. Dünya genelinde 2015 yılında belirlenen yeni HIV enfeksiyonu olgularının %75.4'ünün Sahraaltı Afrika'dan, büyük oranla da batı, güney ve kuzey kesimlerinden olduğu

Alındığı tarih: 18.01.2017

Kabul tarihi: 24.04.2017

Yazışma adresi: Ferhat Gürkan Aslan, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Dekanlık Binası, Korucuk / Sakarya

e-posta: ferhatgurkan33@hotmail.com

belirlenmiştir⁽⁵⁾. Türkiye’de ilk HIV pozitif hasta 1985 yılında bildirilmiş sonraki yıllarda olgu sayısı giderek artmıştır. Türkiye’deki HIV/AIDS olgu sayısı diğer Avrupa ülkelerine göre daha düşük olmakla birlikte, son 4 yılda artan sayıda yeni olguların eklenmesi dikkat çekicidir⁽⁶⁾. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’ndan 2016 yılı Aralık ayında yapılan açıklamada, Türkiye’de 1985 yılından günümüze kadar, doğrulama testi pozitif bulunmuş 12.281 HIV ve 1.485 AIDS olgusu olduğu bildirilmiştir⁽⁷⁾.

Bazı özel gruplar (erkek erkeğe seks yapanlar, seks işçileri, damar içi uyuşturucu kullananlar, transeksüeller ve mahkûmlar) genel popülasyona göre HIV’den, 10-50 kat daha fazla etkilenmektedir. Her yıl dünya genelinde 2 milyondan fazla yeni HIV enfeksiyon olgusu meydana gelmekte ve tüm yeni yetişkin HIV enfeksiyonlarının tahminen %40’ını bu gruplar oluşturmaktadır⁽⁸⁾. Eşcinsel erkekler arasında HIV salgınının, 1990’ların ortalarında yeniden ortaya çıkması, Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Çin gibi dünyanın pek çok yerinde önemli bir halk sağlığı sorunu yaratmıştır. Ülkemizde bu gruplar arasında çok kısıtlı çalışmalar yapılmış olup, Sargın ve Göktaş’ın⁽⁹⁾ yaptığı çalışmada, eşcinsel erkekler arasında HIV prevalansı %12.7 olarak belirlenmiştir. Bu özel grup, düşük prevalanslı bölgelerde HIV enfeksiyonu için yüksek riskli grubu oluşturduğundan tanıs ve terapötik müdahaleler için önemli bir hedef popülasyonu oluşturmaktadır.

Bununla birlikte, bölgesel raporlarda, Sahraaltı Afrika’da 35 ülkede seks işçilerinin son 12 ayda yalnızca %60’ının bir HIV testi yaptırdığı bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Yine Amerika Birleşik Devletleri’nde, damar içi uyuşturucu kullananların ise %49’unun son 12 ay içinde bir HIV testi yaptırdığı tahmin edilmektedir⁽¹¹⁾. Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Ortak Programı (UNAIDS)’ın “90 90 90” hedeflerine ulaşılması (%90’lık kesimin durumundan haberdar olması,

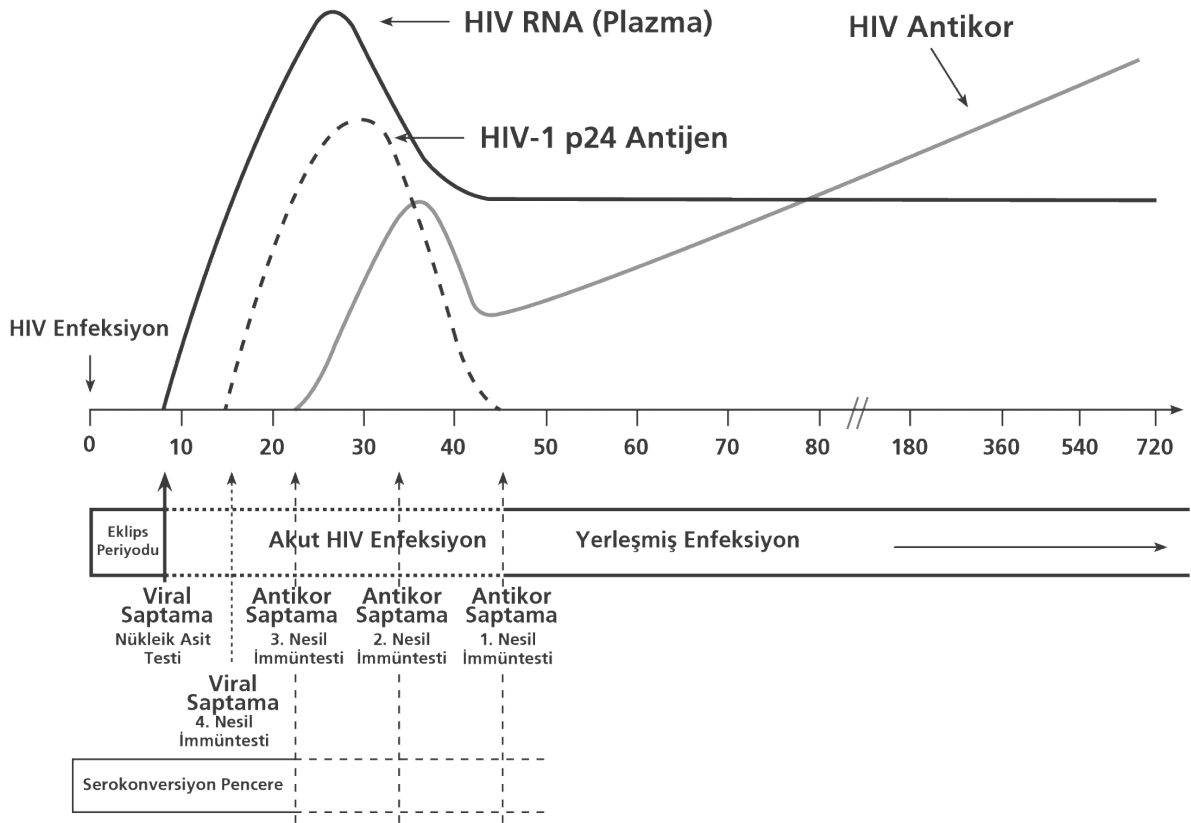
%90’ının antiretroviral tedaviyi (ART) alması ve %90’ında virus supresyonu uygulanması) bu riskli popülasyonların HIV test ve tedavilerine ulaşması konusunda çaba göstermeden olası olmayacaktır⁽⁸⁾.

HIV enfeksiyonunun hızlı, doğru ve erken tanısı AIDS kontrolünde anahtar rol oynar⁽¹⁾. Bu sayede ART erken başlanması ve düzenli takip ile HIV insidansının tespit edilmesinin yanı sıra, sonraki bulaşmalar ve hastalığın progresyonu önlenilmekte, morbidite ve mortalitede azalma sağlanabilmektedir^(12,13).

HIV Tanı Testleri

Doğru ve uygulanabilir tanı testleri ile enfekte bireylerin tespiti, HIV tedavisinin başlanması ve HIV enfeksiyonundan korunmada önemli ve gereklidir⁽¹⁴⁾. HIV enfeksiyonunun laboratuvar tanısı öncelikli olarak serolojik bir tarama testi temeline dayanır. Görece yüksek duyarlılık seviyesi sayesinde, hem HIV spesifik antikorlarını hem de p24 antijenini eşzamanlı saptayan 4. nesil test (Combo Test) kullanılmalıdır. Reaktif sonuç bir doğrulama testi ile onaylatılmalıdır⁽¹⁵⁾.

Plazmada sirküle eden viryonların bileşenleri olan HIV RNA ve p24 antijeni, HIV antikorlarının oluşmasından önce belirlenebilir. İlk olarak, HIV enfeksiyonundan yaklaşık 7-10 gün sonra HIV RNA ortaya çıkar ve PCR ya da diğer nükleik asit amplifikasyon teknolojileri (NAAT) kullanılarak belirlenebilir. Bir sonraki biyolojik göstergenin, HIV RNA’dan yaklaşık 5-7 gün sonra belirlenebilir olan p24 antijeni olduğu görülmektedir (Şekil 1). p24, çok iyi performans karakteristiklerine sahip olan dördüncü nesil, antijen-antikor kombo testleri ile belirlenebilir. Dördüncü nesil laboratuvar immün testleri, Avrupa ülkelerinde rutin hâle gelmiş ve yalnızca HIV antikor saptayan testlerin yerini almıştır. p24’ün ortaya çıkmasından yaklaşık 1 hafta sonra, immünoglobulin M antikorları, üçüncü



Şekil 1. HIV enfeksiyonu laboratuvar belirteçlerinin pozitifleşme zamanı^(12,13,17).

nesil immün testler ile belirlenebilir^(12,13). HIV-spesifik antikorlar olguların %60-%65'inde dört hafta sonra, %80'inde altı hafta sonra, %90'ında sekiz hafta sonra, %95'inde 12 hafta sonra saptanabilir⁽¹⁶⁾.

HIV'in doğru laboratuvar tanısı duyarlılığı ve özgüllüğü maksimuma çıkartan test algoritmalarına bağlıdır. Bu algoritmalarda test kombinasyonları belirlenir ve uyumsuz test sonuçlarının yorumlanması için nasıl bir yol izleneceği belirtilir⁽¹⁷⁾.

HIV testi için olan tanı algoritmaları 1989'dan beri, Amerika'da Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention/CDC) ve Halk Sağlığı Laboratuvarları Derneği (Association of Public Health Laboratories/APHL) tarafından önerilmektedir. Bu algoritmalar duyarlı bir HIV-1 antikor immün testi ile başlamaktadır. Başlangıç testlerinde tek-

rarlayan reaktivite saptanan örneklerde, HIV-1 Western Blot (WB) ya da HIV-1 indirekt immüno floresan test (IFA) gibi daha spesifik HIV-1 antikor testi ile sonuçların doğrulanması önerilmektedir. CDC 1992 yılında, HIV-2 enfeksiyonu olasılığı olanlarda, HIV-1 antikor pozitifliği olmamasına rağmen, HIV hastalığı için klinik kanıt ya da şüphe varsa ve HIV-1 WB sonuçlarında tanımlanamamış bir patern mevcutsa, HIV-1 ve HIV-2 antikorları için spesifik testleri önermiştir. 2004 yılında, CDC reaktif hızlı HIV test sonuçlarının hepsinin, HIV-1 WB ya da HIV-1 IFA ile doğrulanması gerektiğini bildirmiştir⁽¹⁷⁾. Ancak CDC ve APHL tarafından, Aralık 2012'de revize edilen algoritma, HIV-1 ve HIV-2 antikorlarını ve HIV-1 p24 antijenini saptayan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration/FDA) onaylı 4. nesil immün test kombinasyonları ile başlar. Başlangıç testlerinde yineleyen reaktivite saptanan bütün örnekler HIV-1 ile HIV-2 antikorlarını

birbirinden ayıran immün testler ile test edilirler. HIV-1/2 antikor ayırt edici yöntem ile negatif veya belirsiz bulunan örneklerde HIV-1 nükleik asit testi (NAT) uygulanmalıdır. 1989'dan beri ilk kez WB testi HIV test algoritmasında yer almamaktadır⁽¹⁸⁾. WB doğrulama testlerinin beşinci haftada pozitifleşmesi nedeniyle enfeksiyonun akut döneminde negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bununla birlikte, erken dönemde pozitifleşen nükleik asit testleri akut enfeksiyonların tespiti için kılavuzlara eklenmektedir⁽¹⁹⁾.

CDC'nin 2014 yılında yenilediği öneriler doğrultusunda⁽¹⁷⁾ (Şekil 2):

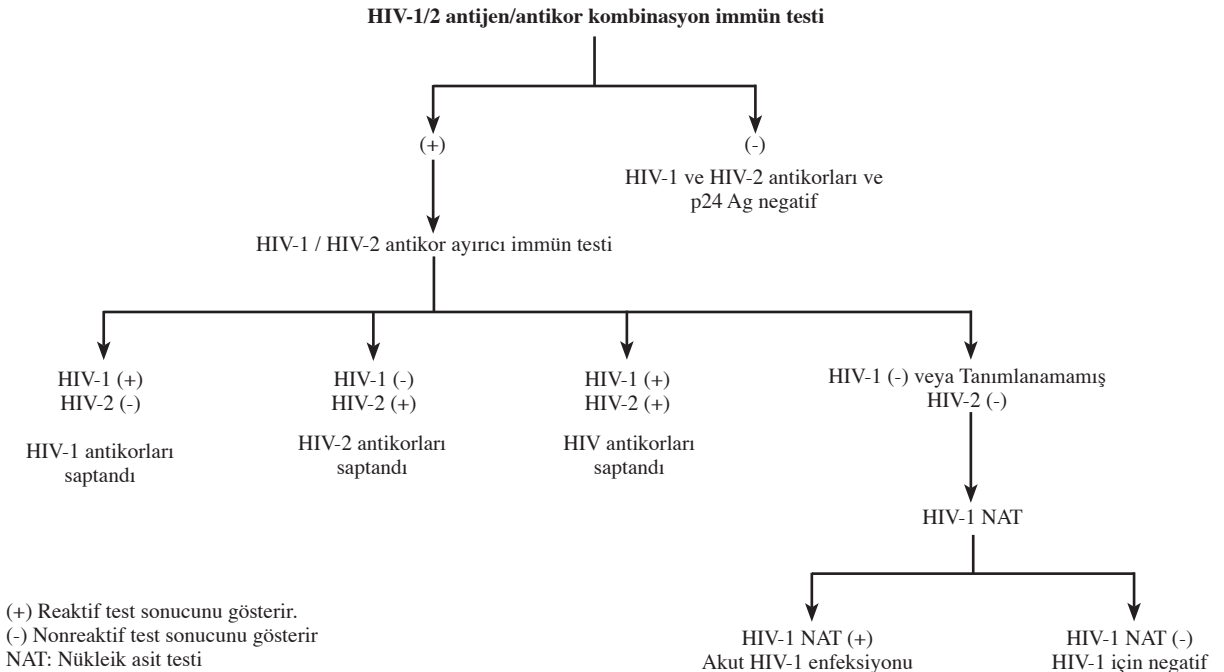
- Reaktif HIV-1 NAT sonuçları ve reaktif olmayan HIV-1/HIV-2 antikor farklılaştırma immün test sonuçları akut HIV-1 enfeksiyonu için laboratuvar kanıtı olarak düşünülmektedir.
- Reaktif HIV-1 NAT sonucu ve HIV-1/HIV-2 antikor farklılaştırma immün testi sonuçları HIV-1 NAT ile doğrulanmış olarak HIV-1 enfeksiyonunun varlığını göstermektedir.

- Negatif HIV-1 NAT sonuçları ve reaktif olmayan ve HIV1/HIV-2 antikor farklılaştırma immün test sonucuna göre sınıflandırılmamış örneklerin sonuçları başlangıç immün testte yalancı pozitif olarak görülmektedir.

Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı tarafından 2013 yılında yayınlamış olan rehberde, doğrulamada kullanılacak testlerin HIV-1 ve HIV-2 enfeksiyonlarının ayırımı sağlamaları gerektiği bildirilmiş, akut enfeksiyon şüphesi olan durumlarda ise NAT ile HIV-1 RNA araştırılması önerilmiştir⁽²⁰⁾.

HIV Serolojisindeki Gelişmeler

1985 yılında FDA onaylı HIV immünyöntem testinin kullanılmaya başlanmasından bu yana HIV tanısı testleri teknolojik anlamda büyük ilerlemeler kaydetmiştir (Tablo 1)⁽²¹⁾. Geleneksel Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yönteminin rutin kullanımı teknik olarak zor olmasının yanında düzenli olarak sağlan-



Şekil 2. Serum veya plazma örnekleri için önerilen laboratuvar HIV test algoritması⁽¹⁷⁾.

Tablo 1. HIV tanısında kullanılan testlerin pozitifleşme zamanı^(22,23).

Yapılan test adı	Test yöntemi	Ortalama pozitifleşme zamanı
1. nesil ELISA Testleri	<i>IgG antikorlu:</i> HIV antikorlarına bağlanması için kullanılan bütün antijenler hücre kültüründe üretilen HIV-1 virüslerinin lizatından elde edilmektedir. İndirekt immün test IgG antikorlarının belirlenmesi için anti-insan IgG etiketli antikorların kullanılması ile uygulanır. Hücrel protein artıkları ile olan etkileşimin önlenmesi için örnek dilüsyonları gereklidir.	35-45 gün
2. nesil ELISA Testleri	<i>IgG antikorlu:</i> HIV antikorlarına bağlanmak için tek başına ya da viral lizatlarla kombine sentetik peptit veya rekombinant protein antijenleri kullanılırlar. İndirekt immün testte işretli anti-insan IgG ya da protein A (yüksek afinite ile IgG ye bağlanır) IgG antikorlarının tespiti için kullanılır. Spesifik antijenik epitopların tasarlanması ile HIV-1 grup O ve HIV-2'ye olan duyarlılık iyileştirilmiştir. Viral lizat artıkları gibi hücrel antijenlerin uzaklaştırılması, hücrel proteinler ile çapraz reaksiyonu önleyerek özgüllüğü artırır.	25-35 gün
3. nesil ELISA Testi	<i>IgM ve IgG antikorlu:</i> HIV antikorlarına bağlanmaları için sentetik peptit veya rekombinant protein antijenleri immünoimetrik antijen sandviç formatı hâlinde kullanılmaktadır (Örnekteki HIV antikorları test substratındaki HIV antijenlerine ve indikatör moleküllerle konjuge antijenlere bağlanır.). Bu IgM ve IgG antikorlarının belirlenmesine izin verir. Düşük örnek dilüsyonları ve daha önce eksprese edilen IgM antikorlarını saptama becerisi erken serokonversiyon sırasında duyarlılığı artırır.	20-30 gün
4. nesil ELISA Testi	<i>IgM ve IgG antikorlu ve p24 antijeni:</i> Sentetik peptit veya rekombinant protein antijenleri 3. nesil testlerde kullanılan aynı antijen sandviç formatında IgM ve IgG antikorlarını belirlemek için kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar da p24 antijeni saptamak üzere dâhil edilmiştir. p24 antijeninin dâhil edilmesi serokonversiyondan önce HIV-1 enfeksiyonunun belirlenmesine izin vermektedir. Bu combo testler genellikle antijen/antikor reaktifliğini ayırmamaktadır.	15-20 gün
Western blot	<i>IgM ve IgG antikorlu:</i> Viral proteinler elektroforez aracılığıyla molekül ağırlıklarına göre bir test şeridine aktarılır. Test şeridi, serum ya da plazma ile inkübe edilir. HIV spesifik antikorlar mevcutsa antijene bağlanır. Enzim kaplı ikinci antikor kullanılarak, antijen-antikor kompleksi test üzerinde görünür hale gelir. Antikor spesifitelerine göre, test şeridinde uyumlu bir bant spektrumu oluşur.	45-60 gün (kesin pozitif)
Nükleik asit testi	<i>RNA:</i> HIV nükleik asidinin ekstraksiyonu, PCR ile amplifikasyon veya diğer yöntemler; HIV RNA'sının <i>in vitro</i> tespiti.	5-15 gün

ması gereken aletler ve sürekli elektrik kaynağı gerektirdiği için terk edilmiştir. ELISA kitleri hem doğal hem de rekombinan antijenleri kullanılmaktadır. Bunların yeni bulunan türlere karşı duyarlılığının artması için sürekli olarak güncellenmeleri gerekir. Dördüncü kuşak ELISA, duyarlılığı artıracak şekilde p24 antijeni varlığını tanı⁽¹⁴⁾. Farklı prensiplere dayanan HIV immün testleri genel olarak “jenerasyonlar/nesil” olarak gruplanırlar.

Geçtiğimiz yıllarda enfeksiyöz patojenlerin belirlenmesinde basit, ucuz, doğru ve hızlı tanı testleri geliştirilmiş, mevcut testler iyileştirilmiştir. Global sağlık kuruluşlarının artan istekleri doğrultusunda, HIV/AIDS için daha basit ve etkin testlerin geliştirilmesi ve bunu

yaparken de hasta bakımının kalitesinin düşürülmemesi üzerinde durulmaktadır⁽³⁾. Kolay uygulanabilen işlem basamakları ile hızlı tanısal test (HTT) kitleri, standart laboratuvar birimlerinin dışında testlerin yapılabilmesini olası kılmış, hastalar hâlen klinikte iken test sonuçları elde edilebilmesini sağlamış ve testlere erişimi artırmıştır. Kırsal şartlarda mevcut HTT'e artan erişim, daha çok kişinin HIV açısından durumlarını öğrenebilmelerini, danışmanlık hizmeti almalarını ve eğer enfekte iseler tedavi olmalarını olası kılmıştır. Bu durum, HIV epidemisini yavaşlatmak için olan çabalar açısından çığır açmış ve HIV enfekte kişileri belirlemek ve tedavi sağlamak adına stratejiler geliştirilmesi için umut verici olmuştur^(14,21).

“Hasta başı test” olarak adlandırılan bu testlerin analitik hedefleri, proteinler, nükleik asitler, metabolitler, ilaçlar, çözünen iyonlar ve gazlar, insan hücreleri ve mikroorganizmalardır⁽³⁾. Test materyali olarak plazma ve seruma ek olarak, tam kan ya da kapiller kan uygundur. Bazı test sistemlerinde idrar ya da oral transuda (tükürük değil) kullanılabilir. Fakat plazma ve serum dışındaki örnekler kullanıldığında, hızlı testler daha az hassasiyet gösterir. Hızlı testler, en genel hâliyle immüno-kromatografik yöntemlere dayalıdır. Parçacık aglütinasyonu ve immüno-filtrasyon da kullanılan teknikler arasındadır. Sonuçlar 15 ilâ 30 dakika arasında belli olur^(3,24,25). Hızlı HIV testleri gönüllü HIV danışmanlığı, antenatal tarama, acil operasyonlar, iğne-kesici alet yaralanmaları ve popülasyon taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı testler yalnızca ilk oryantasyon döneminde kullanılmalı ve test sonuçları ilk fırsatta rutin bir laboratuvar da standart HIV testi ile doğrulanmalıdır. Hızlı HIV testlerinin kullanıma girmesi HIV test programlarının artmasına katkıda bulunmuş ve başka türlü tanı konulamayacak olan kişilerde HIV tanısı konulmasını olanaklı kılmıştır. Çok yüksek hastalık yükü ve zayıf bir sağlık sektörü olan Sahraaltı Afrika’ında bu daha da belirgindir⁽¹⁴⁾.

Birçok hızlı test kitinin duyarlılığı geleneksel enzim immunoassay’lerle karşılaştırılabilir. Eller ve ark.⁽²⁶⁾ Uganda’da %98.6 duyarlılık ve %99 özgüllük bildirmişlerdir. Bu birkaç çalışmanın sonuçlarıyla da örtüşmektedir⁽²⁷⁻²⁹⁾. Bu sonuçlar DSÖ’nün %98 duyarlılık ve %99 özgüllük ölçütlerini karşılamaktadır. Hızlı HIV testleri hasta başı gerçek zamanlı test yapmak için geliştirilmiştir ve test kalitesi kullanıcıya ve test kitine bağlıdır⁽¹⁴⁾. HTT’ler ile elde edilebilen oldukça kesin test sonuçlarına rağmen, geleneksel laboratuvar şartlarının dışında doğru sonuç elde etmenin zorlukları mevcuttur ve yanlış pozitif veya yanlış negatif test sonuçlarının bildirildiği şüpheli durumlar rapor edilmiştir⁽³⁰⁾. Laboratu-

varda yapılan testlerde olduğu gibi laboratuvar dışında yapılan testler için de test performansı açısından farklılıklar söz konusudur. Ancak testlerin kalite kontrolünün sağlanması, laboratuvar dışı şartlarda daha zor olabilir⁽²¹⁾.

Telekomünikasyon alanındaki teknolojik ilerlemeler, sınırlı kaynak olan koşullar için hasta başı HIV tanı testlerinin geliştirilmesinde ümit vadeden bir fırsat sunmaktadır. Geçtiğimiz on yılda, cep telefonları geliştirmekte olan ülkelerde hızlı şekilde piyasaya girmiştir. Cep telefonlarının veri paylaşma kabiliyetleri, sınırlı kaynak şartlarında ucuz ve hızlı hasta başı testlerin geliştirilmesi için etkin şekilde kullanılabilir. Cep telefonlarının sensörleri, ekranları mevcuttur ve veri saklama yanında güç hesaplamaları da yapabilmek kapasitesine sahiptirler. Biyogölgeleme için basit ve ucuz aksesuarların eklenmesi ile daha da güçlendirilebilirler. Yüksek çözünürlüklü cep telefonu kameraları, biyolojik örneklerde floresan işaretlenmiş hedef hücre veya moleküllerin görüntülenmesi için kullanılmıştır. Buna örnek olarak lateral-flow immün yöntemler, kuantum nokta-temelli floresans tayin ve floresans mikroskopi verilebilir. Ucuz ve portatif optik bileşenlerin eklenmesi yoluyla, cep telefonu bir spektrometre gibi kullanılabilir. Cep telefonlarının biyogölgeleyici cihazlar olarak kullanılması ile uygun maliyetli, portatif, ucuz ve kullanımı kolay olan ve şu anda yalnızca laboratuvar temelli, sofistike ve pahalı cihazlar ile sağlanabilen test metotlarının oluşturulması mümkündür. Bunun gibi ilerlemeler, sınırlı kaynak koşullarında HIV/AIDS’in tespiti ve tedavi izlemi için yeni biyosensör kategorilerinin geliştirilmesinde çok önemli roller oynayabilir⁽⁴⁾.

HIV Nükleik Asit Testlerindeki Gelişmeler

Serolojik test sistemlerine ek olarak, HIV RNA’yı belirleyebilecek moleküler metotlar (nükleik asit amplifikasyon testleri/NAT) mevcuttur. PCR, HIV RNA tespiti için en sık kulla-

nılan nükleik asit amplifikasyon testidir. Diğer teknikler (b-DNA, NASBA) daha az kullanılmaktadır. HIV RNA'nın kantitatif tespiti HIV enfeksiyonu izleminin esas unsurlarından biridir⁽³¹⁾. NAT'ların enfeksiyonu düşük seviyelerinde bile belirleyebilmesi ve ölçüm yapabilmesi gibi birçok avantajı mevcuttur. PCR enzim tabanlı bir süreçtir ve *in vitro* olarak DNA'nın kısa parçalarının çoğaltılması esasına dayanır. Basitliği ve amplifikasyon gücüne rağmen, PCR teknolojisinin de kısıtlılıkları mevcuttur. Özellikle termal cihazların hızlarında ve boyutunda, reaksiyon hacminde hâlâ geliştirilmesi gerekenler vardır. Büyük ve geniş konvensiyonel termal reaksiyon cihazlarında kullanılan büyük boyutta reaksiyon hacimleri, sıcaklık transfer hızı ve reaksiyonun verimliliği açısından zorlayıcı bir faktördür⁽³⁾.

Şüpheli akut enfeksiyonda, şüpheli serolojik durumlarda ya da 18 ay altındakilerde HIV enfeksiyonunun belirlenmesinde nükleik asit amplifikasyon testleri yeğlenmektedir. Kan ürünlerinin güvenliğini artırmak için, HIV PCR kan bağıışı durumunda da kullanılmalıdır. HIV-1 RNA'sı enfeksiyondan sonra erken dönemde saptanabilir ve HIV-1 DNA ve/veya RNA örnekleri aktif enfeksiyonun göstergesidir. Yeni önerilere göre, PCR analizi, reaktif tarama testi sonucunun doğrulanmasında WB yerine kullanılabilir. Bu amaçla, virüs yükü 1000 kopya/ml üzerindeyse, PCR testi pozitif kabul edilir⁽³²⁾. Eğer viral yük bu değerin altındaysa, WB analizi uygulamak zorunlu hâle gelir. Fakat HIV PCR, bir tarama testi olarak önerilmez, hatalı negatif sonuçlar olasılık dâhilinde olduğundan serolojik testin yerini alamamaktadır^(3,32).

Viral yükün değerlendirilmesi, klinik seyrin en iyi göstergelerinden biri olması yanında HIV-pozitif hastalarda tedaviye yanıtı değerlendirmede kullanılan başlıca parametredir. Tedavi başarısızlığını belirlemede ve sonuçta ilaç direncine yol açabilecek ve ikinci aşama AIDS ilaçlarına

geçmeyi gerektirecek mutasyonların birikiminden kaçınmada etkili bir yöntemdir⁽²¹⁾. CD4 sayıları ART izlemi için kullanılsa da, son zamanlardaki çalışmalar bu testlerin erken tedavi hataları ya da başarısızlıklarını belirlemede yeterli olmayacağına işaret etmektedir. Viral yük testi için altın standart olan yöntem reverse transkriptaz (RT)-qPCR'dır⁽³⁾.

Bununla birlikte, viral yük testi HIV çeşitliliği yanı sıra, eğitilmiş uygulayıcılar, pahalı ajanlar, elektrik gereksinimi olan ekipmanlar ve laboratuvar altyapısı gerektirmesi ve örneklerin taşınmasında zorluklar olması gibi bazı pratik uygulamalar açısından zorluklar içerir⁽³⁾. Bu nedenle, yetenekli personele sahip gelişmiş laboratuvarlar olmadıkça düşük-orta gelirli ülkelerde kullanımları zordur⁽²¹⁾.

Son zamanlarda, viral yük ölçümlerini basitleştiren gelişmeler iki alanda gerçekleşmiştir: Kırsal alanlarda kan örneklerinin toplanması ve referans laboratuvara nakledilmesini kolaylaştıran kurutulmuş kan damlaları (KKD) ve ikinci olarak düşük-orta gelirli ülkelerde viral yük ölçümü için olası bir alternatif olabilecek hasta başı viral yük cihazlarının geliştirilmesi. Çeşitli çalışmalarda, KKD'nin, COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan® v2.0 (Roche Molecular Systems), Real-Time HIV-1® (Abbott), VERSANT HIV-1 RNA 1.0® assay (kPCR) (Siemens) ve Nuclisense real-time NASBA Amplification® (BioMérieux) gibi majör markaların viral yük tayin platformları kullanılarak viral yük ölçümü için uygun oldukları gösterilmiştir⁽³³⁾. Hassasiyet aralıkları, plazma değerleri ile korelasyonu ve viral yükün fazla olmadığı dirençli formların birikiminin belirlenmesi konusunda değerlendirmeler sürmektedir⁽²¹⁾.

KKD kullanım olasılığı ile dâhi bu otomatize yüksek hacimli cihazları destekleyebilecek nitelikte laboratuvarların azlığı, viral yük testlerinin görece yüksek maliyeti ve KKD kullanımından

kaynaklanan azalmış hassasiyet nedeniyle rutin viral yük ölçümüne erişimi kısıtlayan faktörler var olmaya devam etmektedir. Sonuç olarak, yüksek hassasiyete sahip, kullanımı kolay, uygun maliyetli, altyapı harcamaları gerektirmeyen, örnek transportu ihtiyacını azaltan ya da ortadan kaldıran, çabuk klinik karar alınması için aynı gün içinde sonuç alınma olanağı sağlayan, çabuk sonuç veren hasta başı viral yük ölçüm (HB VYÖ) cihazlarının geliştirilmesi için çabalar artmıştır. Son yıllarda ortaya konan en gelişmiş teknolojilerden ikisi Alere Q® ve SAMBA®'dır, ancak ümit vadeci HB VYÖ ürünleri de yoldadır. Bununla birlikte, az hacim ve düşük hassasiyetten kaynaklanan HB VYÖ'ünün kısıtlamaları nedeniyle, her ülkenin, bu HB VYÖ platformlarını ulusal stratejik plana ve ülkenin gereksinimlerine en iyi nasıl entegre edeceği konusunda bir şablon geliştirmeleri gerekebilir⁽²¹⁾.

İlaç Direnci Testleri

HIV replikasyonunun baskılanmasında kullanılan antiretroviral ilacın, dirençli olmayan suşlara göre daha yüksek konsantrasyonda kullanılması gereksinimi, antiretroviral ilaç direnci olarak tanımlanabilir⁽³⁴⁾. İlaç direnci testi, ART etkinliğini arttırmak ve ilaca dirençli varyantların bulaşmasını azaltmak üzere HIV'in klinik yönetiminin tamamlayıcı bir parçasıdır. İlaç direnci testi için iki strateji geliştirilmiştir: Fenotipik testler ve genotipik testler⁽⁴⁾. Genotipik ve fenotipik direnç testleri viral suşların değerlendirilmesi ve seçilecek tedavi stratejileri için kullanılır. Bu testler, nükleosid ters transkriptaz inhibitörlerine, non-nükleozid ters transkriptaz inhibitörlerine, proteaz inhibitörlerine ve integras transfer inhibitörlerine karşı direnç hakkında bilgi sağlar⁽³⁵⁾.

Fenotipik analizler, bir virüsün ARV ilaçlarının farklı konsantrasyonlarında replike olabilme yeteneğini ölçer⁽³⁵⁾. Referans laboratuvar suşuna, hastaya ait virüslerin proteaz ya da revers trans-

kriptaz ve son dönemde integras ve zarf gen dizileri entegre edilerek, belirli bir ilacın varlığı veya yokluğunda, ilaca duyarlılıkları değerlendirilir⁽⁴⁾. *İn vitro* koşullarda viral replikasyonu %50 ya da %90 oranında baskılayabilen ilaç konsantrasyonu virüslerin ilaçlara duyarlılığını gösterir. Duyarlılığı azalan virüslerin çoğalması, ilaç konsantrasyonu artırılarak baskılanabilir. IC₅₀ değerleri oranlanarak test edilen virüsün IC₅₀'sinin, referans virüs IC₅₀'sinin kaç katı olduğu belirlenir ve bu değer sınır değer ile karşılaştırılır. Sınır değer virüsün baskılanması ya da duyarlı olarak sınıflandırılabilmesi için virüsün IC₅₀ değerinin kaç kat artırılması gerektiğini gösterir^(34,35).

Genotipik analizler, viral genlerde ilaç direnci ile ilişkili mutasyonları saptar. Genotipik direnç testleri daha hızlıdır ve DNA sekans teknolojilerindeki ilerlemeler sayesinde daha uygun fiyatlıdır. Bu yöntemde, proteaz, revers transkriptaz ve integras kodlayan genlerin ilaç direnciyle ilişkili mutasyonları belirlenir. Dizi analizi ile genotipik antiretroviral direnç testi için kullanıma sunulmuş ticari kitler sınırlı sayıdadır. TRUEGENE HIV-1 Genotipleme Kiti (Siemens Medical Solutions, Inc., ABD, Malvern, PA) ve ViroSeq HIV-1 Genotipleme Sistemi (Celera Diagnostics, Alameda, CA, ABD) adındaki iki testin FDA onayı bulunmaktadır. Bunların yanı sıra laboratuvarlarda tasarlanmış testler de direnç analizi için kullanılmaktadır. Ticari testlerin yinelenememesi testi kolaylaştırırsa da, klinik örneklerden elde edilen HIV-1'in kalıtsal varyasyonları test sonuçlarının yorumlamasını kompleks hâle getirir. Bu testlerde sonuçların yorumlanması üreticilerin geliştirdikleri veri tabanları kullanılarak yapılmaktadır. Laboratuvarlarda tasarlanmış testlere ait sonuçların değerlendirilmesinde ise web sitelerinde bulunan değerlendirme programları kullanılmaktadır. Hastalara ait elde edilen direnç sonuçları bu veri tabanları yardımıyla değerlendirilerek test edilen virüsün direnç durumu ve ilaçlara özgü IC₅₀ değerleri yorumlanmaktadır.

Son yirmi yılda HIV ilaç direnci testlerindeki ilerlemelere karşın, maliyetleri, altyapı ve eğitilmiş teknisyen gerektirmeleri nedeni ile fenotipik ve genotipik testler merkez laboratuvarları dışında yapılamamaktadır^(4,34,35).

Mevcut rehberlere göre, tedaviye başlama kararı ne olursa olsun enfeksiyon belirlendiğinde (bazal ilaç direnci) ve tedavide istenen başarının sağlanamaması durumunda ilaç direnci testlerinin yapılması önerilmektedir^(19,20). Primer direnç mutasyonu taşıyan HIV suşu ile enfeksiyon (aktarılmış ilaç direnci) tedavi başarısızlığına yol açabileceğinden gelişmiş ülkelerin çoğunda bazal direnç sürveyansı yapılmaktadır. Direnç gelişiminin önlenmesi ve değerlendirilmesi için gelişmemiş ya da gelişmekte olan ülkelere de bazal direnç bakılması önerilmektedir. Ülkemizde Yalçınkaya ve Köse⁽³⁶⁾ yaptıkları çalışmada, tedavi almamış olgularda ilaç direnç oranını %10 olarak belirlemişlerdir. Kuşkucu ve ark.'nın^(19,37) yaptığı ve 2004-2015 yıllarını kapsayan çalışmada da, aktarılmış direnç oranı %10 olarak bildirilmiştir.

Yeni Doğanlarda HIV Tanısı

Gelişmekte olan ülkelere, anneden çocuğa bulaş (AÇB), bebeklerde HIV enfeksiyonunun primer nedeni olmaya devam etmektedir. HIV ile enfekte annelerde HIV'in zamanında saptanması ve ART başlanması AÇB'ı etkin şekilde önleyebilir⁽⁴⁾.

Gebeliğin 32. haftasında antikorların transplental transferi gerçekleşir fakat bu herhangi bir koruyucu etki sağlamaz. HIV ile enfekte annelerin yenidoğan bebeklerinde, anneye ait antikorlar 18. aya kadar bebek vücudunda saptanabilir. Vertikal bulaşın saptanmasında veya dışlanmasında serolojik bir HIV testi hiçbir durumda pozitif sonuç için yeterli kabul edilmez^(4,38).

Anne HIV antikorunu plasentayı geçmekte ve

HIV'e maruz kalan tüm yenidoğanlarda saptanabilmektedir, bu nedenle yenidoğanlarda HIV tanısı için standart antikor testleri kullanılmamalıdır⁽³⁹⁾.

Anneden geçen antikorlar nedeniyle, bebeklik döneminde HIV saptama metotları, 18 aydan daha büyük çocuklar ve yetişkinlerde kullanılan standart test yöntemlerinden farklıdır. DSÖ bu gibi durumlar için doğrudan HIV-1 DNA ve/veya RNA'yı belirleyen virolojik yöntemleri önermektedir⁽⁴⁰⁾.

HIV DNA PCR, periferik kan mononükleer hücrelerdeki spesifik HIV viral DNA'sını saptamak için kullanılan hassas bir tekniktir. HIV DNA PCR'nın özgüllüğü, doğumda %99.8 ve doğum sonrası 1., 3. ve 6. aylarda %100'dür. Araştırmalar, HIV DNA PCR testlerinin, doğumdan sonraki yaşamın ilk haftasında enfekte infantların %20-55'ini tanımladığını göstermiştir. Ancak bu oran artış göstererek yaşamın ilk 2-4 haftası içerisinde %90'ın üzerine, 3 ay 6 aylık dönemlerde ise %100'e ulaşmaktadır. HIV DNA PCR testleri alt tip B dışı HIV saptanmasında azalmış duyarlılığa sahiptir ve B dışı alt tiplerle enfekte infantlarda yalancı negatiflikler bildirilmiştir. Günümüzde mevcut real-time HIV RNA PCR testleri ve tanı koydurucu kalitatif RNA testi non-B alt tip HIV enfeksiyonunun ve daha ender görülen grup O suşlarının saptanması için geliştirilmiş duyarlılığa sahiptir⁽⁴¹⁾.

Bebeklerde HIV enfeksiyonunun doğru şekilde saptanması ART'nin erken dönemde başlanması ve diğer destek bakımı açısından büyük öneme sahiptir. Diğer taraftan, enfekte olmayan bebeklerin gereksiz tedavisi potansiyel ilaç ilişkili toksisite gibi olumsuz uzun dönem etkilere neden olabilir⁽⁴⁾.

HIV bulaşını dışlamak için en az 2 negatif PCR sonucu gereklidir. İlk HIV PCR, doğumun 1. ayında yapılmalı (duyarlılık %96, özgüllük

%99), %100 duyarlılık ve özgülüğü yakalayabilmek için 3. aydan sonra test yinelenmelidir. Bu arada emzirme ile yine bir aktarım riski oluşmadıysa, vertikal bulaş dışlanabilir⁽³²⁾. Negatif PCR sonuçlarında dahi anneye ait antikorlara rastlanmadığı belgelendirilmelidir. Pozitif sonuç durumlarında ise ikinci bir örnek testiyle kesinlikle konfirme edilmelidir.

HIV, biri 14. günden sonra, diğeri 1. aydan sonra yapılan, iki veya daha fazla negatif test ile dışlanmış varsayılabilir. Anne sütü almayan bebeklerde HIV'in kesin olarak dışlanması ise bir tanesi 1. aydan sonra ve diğeri 4. aydan sonra yapılan iki veya daha fazla negatif virolojik test ile olabilir. Birçok uzman, HIV negatifliğini 12-18 ay arasında yapılan HIV antikor testi ile doğrular. HIV antikorlarının sürekliliği, 18 ay veya daha sonrasında ender olarak ortaya çıkabilir⁽³⁹⁾.

Tedavi ve Korunma

HIV enfeksiyonu, laboratuvar testlerindeki ilerlemeler sayesinde, günümüzde tanısının erken konması, düzenli takipler ve ART uygulamaları ile kronik hastalık hâline gelmiştir. Geçen süre içerisinde daha etkili, kullanımı daha kolay, yan etkileri daha az ve genetik bariyeri daha yüksek yeni ART seçenekleri oluşturulmuştur. Tedavinin hedefleri yaşam kalitesini arttırmak, HIV'e bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltmaktır⁽⁴²⁾. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2013 yılı kılavuzlarında CD4 (+) T lenfosit sayısı 500 hücre/µl'nin altına düştüğünde erken ART başlanmasını önermektedir. Yeni kılavuzlar ayrıca ART başarısızlığını test etmek için rutin ve hedefe yönelik viral yük testi yapılmasını ısrarla istemektedirler⁽⁴⁾. Günümüzde CD4 hücre sayısından bağımsız olarak tüm hastalara ömür boyu antiretroviral tedavi uygulanmasının daha yararlı olduğu bildirilmiştir. Naif hastanın tedavisinde iki ya da daha fazla sınıftan en az iki tercihen üç ilaçlı kombinasyonlar kullanılmalıdır. İki nükleozid revers transkriptaz

inhibitöründen oluşan antiretroviral rejimde, bu kombinasyona integras inhibitörü veya ritonavir/kobisistat ile güçlendirilmiş proteaz inhibitörü veya non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörü eklenmelidir. Güncel rehberlerde integras inhibitörlü kombinasyonlar virolojik etkinlik, kullanım kolaylığı ve düşük yan etki oranı nedeniyle ilk seçenek tedavide yer almaktadır. Antiretroviral tedavi seçimi yapılırken birçok faktör göz önünde bulundurularak tedavi bireyselleştirilmeli ve en uygun rejim seçilmelidir⁽⁴²⁾.

ART kullanımı kişinin HIV'i başkalarına bulaştırmasını önlemede de etkilidir. Günümüzde HIV'in önlenmesinde her zamankinden daha fazla seçenek bulunmaktadır. Cinsel partnerin tek olması, kondom kullanımı, daha az riskli cinsel davranışlar, ortak iğne kullanılmamasına ek olarak maruziyet öncesi ve maruziyet sonrası yeni ilaçlardan yararlanılabilir⁽⁴³⁾. Maruziyet öncesi proflaksi (MÖP), HIV için yüksek risk altındaki kişilerin, enfekte olma olasılıklarını düşürmek için günlük olarak HIV ilaçları almalarıdır. Seks veya intravenöz ilaç kullanımı (İVİK) gibi yollarla virüse maruz kalındığı durumlarda MÖP enfeksiyon gelişimini önleyebilmektedir. Günlük proflaksi kullanımı cinsel yolla HIV bulaş riskini %90'ın üzerinde, ilaç kullanıcılarında %70 oranında azaltmaktadır. MÖP ek olarak diğer korunma yöntemlerinin de uygulanması HIV bulaş riskini daha da düşürecektir^(44,45). Riskli bir olay sonrasında antiretroviral ilaç kullanımı ise maruziyet sonrası proflaksi (MSP) olarak adlandırılmaktadır. Proflaksi, olası bir maruziyet sonrası olabilen en kısa sürede başlatılmalıdır. Yapılan çalışmalarda, mesleki olmayan maruziyetlerde 3 gün içerisinde başlanıp 28 gün devam edilen tedavilerin, enfekte olma riskini önemli düzeyde azaltabildiğini bildirilmiştir. Sağlık çalışanlarına mesleki maruziyet durumunda ilk 36 saat içerisinde, tercihen 2 saatte proflaksi başlanmalıdır. HIV enfekte gebelerde ise, hamilelik

ve doğum sırasında ART kullanımı yoluyla annedeki viral yükün supresyonunun sağlanması perinatal bulaşın önlenmesinin en önemli yoludur. Ayrıca doğum sonrası yenidoğanlara 6 hafta süreyle tedavi verilir. Annenin aldığı ART'ye rağmen, anne sütüyle beslenmeye, geçiş riski taşımasından dolayı izin verilmemelidir⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Kombine antiretroviral tedaviye (KART) değişken oranlarda gözlenen tedavi uyumu, ilaçlara sınırlı erişim imkanı ve zayıf altyapı olanakları gibi bazı toplum sağlığı sorunları, HIV-1 aşısının hâlen gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. KART, HIV-1 tedavisinde belirgin bir ilerlemeye yol açmış olsa da, virüs, akut enfeksiyonun erken safhasında oluşan bir viral rezervuar içinde varlığını sürdürür, bu da aşının etkili olacağı, yalnızca kısa bir zaman dilimi bulunduğuna işaret etmektedir. Ayrıca, HIV-1 çeşitliliğinin de oldukça fazla olması, başarılı bir küresel aşının dizaynını zorlaştırmaktadır. Yine de yakın zamanlı prelinik ve klinik aşı çalışmalarında, enfeksiyona karşı korunma ile ilgili olduğu gözlenen ve aşı ile oluşturulan çeşitli bağışıklık yanıtları belirlenmiştir. Bu bulgular istatistiksel ilişkiler düzeyinde olup korunmayı sağlayacak mekanizmalar olup olmadıkları bilinmese de, HIV-1 aşı geliştirilmesi yolunda önemli mihenk taşlarıdır ve yeni nesil HIV-1 aşıları ile araştırılacak bilimsel hipotezler sunmaktadırlar⁽⁴⁹⁾.

Yeni Biobelirteçler

Kontrol altında tutulamayan kronik enfeksiyonlar (örneğin, HIV-1 enfeksiyonu) kalıcı ve sürekli oluşan immün yanıtlar ve ilerleyen immünpatolojiler ile ilişkilendirilmektedir. Bu süreçler edinilmiş ve adaptif immün aktivasyon ile ilgili çözünür belirteçlerin ortaya çıkmasına, hücre ölümüne ve dokunun yapısının bozulmasına neden olurlar⁽⁵⁰⁾.

Akut HIV-1 enfeksiyonu sırasında gerçekleşen olaylar hastalığın sonraki seyri açısından önemli olabilir. Proteomik bazlı bir taramada, bağışıklık yanıtının ilk sinyali olarak akut faz proteini serum amiloid A'nın (A-SAA) arttığı görülmüştür. A-SAA'nın antiviral özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir ve ölçülebilen ilk viral RNA'nın ortaya çıkışından 5 gün önce belirlenmiştir. Dolayısıyla hiperakut enfeksiyon için olası bir biyobelirteç görevi görebilir. A-SAA bifazik bir yanıt göstermiş; ilki viral eklips fazında ve ikincisi de akut HIV-1 enfeksiyonu ile ilişkilendirilen sitokin fırtınası ile örtüşen viral ekspansiyon fazında gözlenmiştir⁽⁵⁰⁾.

Akut enfeksiyondaki sitokin fırtınası sırasında bağışıklık sistemi, virüs üremesine ve rezervuar oluşumuna yardımcı veya engel olacak şekilde işlev görebilen çok sayıda sitokin üretir. İki çalışmada, enfeksiyondan önce başlayıp enfeksiyon sonrası 3 haftalık dönem boyunca⁽⁵¹⁾ ve post-enfeksiyon 16-24 haftaya kadar olan takipte⁽⁵²⁾ bir dizi sitokin araştırılmıştır. Çözünebilir olan bu faktörler, sonraki klinik gelişme için biyobelirteç adayları olarak görülebilir. Bu sonuçlardan yola çıkarak Jiao ve ark.⁽⁵³⁾, Fiebig evreleri III, IV ve V boyunca yüksek düzeylerdeki IFN γ -induced protein 10'un (IP-10), enfeksiyon başlangıcından 2 yıl sonraki düşük CD4 hücre sayıları ile güçlü bir ilişki gösterdiğini bulmuştur. Bu sonuç, IP-10'un hastalık seyri açısından kullanışlı bir akut faz biyobelirteci olabileceğini düşündürmektedir. Roberts ve ark.⁽⁵⁴⁾, başlangıçtaki enfeksiyondan altı hafta sonra tümör nekroz faktörü (TNF), IP-10 ve interleukin (IL)-10'un yükseldiğini doğrulamışlar ve ayrıca enfeksiyondan 12 ay sonraki viral yük karar düzeyini tahmin etmek için kullanılabilecek, akut enfeksiyon sırasında ölçülen beş sitokinden oluşan bir model öne sürmüşlerdir. IL-12p40/70, IFN γ , IL-7 ve IL-15'in plazma konsantrasyonları birlikte kullanıldığında, viral karar düzey varyasyonunun %66'sı tahmin edilebilmiştir⁽⁵⁰⁾.

HIV maruziyeti PD-1 ekspresyonunda da artışa neden olur. HIV viral yükü ile orantılı olarak HIV spesifik CD8 (+) hücrelerdeki PD-1 ekspresyonu tükenmeye neden olur. Bir HIV proteini olan Nef'in, PD-1'in ekspresyonunu artırmak için MAPK-bağımlı bir yolağı kullandığı ve PD-1'in sitotoksik T lenfositlerin işlevlerini bozduğu gösterilmiştir. Bu durum HIV enfeksiyonunun karakteristik özelliği olan azalmış bağışıklık yanıtının oluşumuna katkı sağlar. Ancak, viral yükün geleneksel tedaviler ile kontrol edilmesi PD-1 ekspresyonunda azalmaya neden olur. Sitotoksik T lenfositlerde PD-L1'in PD-1'e bağlanmasının bloke edilmesi sitotoksik T hücrelerinde artışa neden olmuştur ve daha güçlü adaptif bağışıklık yanıtının oluşturulmasına katkı sağlayabilir. Bu veriler, PD-1'in HIV tedavisi için güçlü bir hedef olabileceğine işaret etmektedir⁽⁵⁵⁾.

HIV ile enfekte hastalarda T hücrelerinde Tim-3 ekspresyonu artmıştır. Gal-9'un Tim-3'e bağlanmasının bu hücreleri HIV-1 enfeksiyonuna ve replikasyonuna daha az yatkın kıldığı gösterilmiştir. Aktive CD4 (+) T hücrelerinde Gal-9/Tim-3 etkileşimi HIV-1 ko-reseptörlerinin down-regülasyonuna ve siklin-bağımlı kinaz inhibitör p21'in up-regülasyonuna yol açar. HIV'in kronik aşaması boyunca bu etkileşim Th1 ve Tc1 hücrelerde tükenmeye neden olabilir. Dolayısıyla, kronik enfeksiyon sırasında Tim-3 eksprese eden T hücrelerinin düzgün şekilde işlev görme ve sayıca artma yetenekleri sekteye uğrar. Tim-3 negatif olan CD8 (+) hücrelerinin, Tim-3 (+) CD8 (+) hücrelerine kıyasla daha iyi degranüle olma yeteneği gösterdikleri bulunmuştur. Tim-3 (+) hücrelerde Tim-3 yolaklarının bloke edilmesinin perforin salımına yol açarak sitotoksik yeteneği ve kazanılmış bağışıklık yanıtını artırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, Tim-3'ün bloke edilmesinin kronik HIV enfeksiyonunun tedavisinde güçlü bir terapötik teknik olabileceğine işaret

etmektedir⁽⁵⁵⁾.

Sonuç

Yeni HIV enfeksiyonlarının kesin tanısı önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Erken HIV enfeksiyonlarının (EHE) belirlenmesinin kişisel sağlık, HIV bulaşmasının önlenmesi ve HIV insidansının ölçümü ve tedavi müdahalelerinde etkileri bulunmaktadır. Bireysel ve popülasyon seviyelerinde EHE'lerin belirlenmesinde önemli birçok gelişme mevcuttur. HIV'in doğru laboratuvar tanısı genel duyarlılığı ve özgüllüğü maksimuma çıkartan test algoritmalarına bağlıdır. ABD ve Avrupa'da laboratuvar tabanlı tanısız algoritmalar, daha erken HIV belirlemesine imkan veren şekilde dördüncü nesil HIV anti-jen testlerini içermektedir. Reaktif antijen/antikor immün test sonucu veren örnekler HIV-1 ve HIV-2 antikorlarını birbirinden ayırabilen FDA onaylı antikor immün testi ile test edilmelidir. Başlangıç antijen/antikor kombinasyon immün testlerde reaktif olan ve HIV-1/HIV-2 antikor farklılaştırma immün testlerinde nonreaktif veya belirsiz olan örnekler FDA onaylı HIV-1 NAT ile test edilmelidir. Daha önceki önerilen testlerle karşılaştırıldığında, güncellenmiş algoritma akut HIV-1 enfeksiyonu için olan duyarlılığı arttırmaktadır. Bununla birlikte, birçok çözünür biyobelirtecin enfeksiyon sırasında HIV-1 hastalığının birçok basamağıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hastalık basamakları ya da hastalığın belirlenmesi ve çözünür biyobelirteçler arasındaki korelasyonlar bu karmaşık hastalığı anlamamızda bize yol göstericidir. Olasılıkla, HIV-1 enfeksiyonunda biyobelirteç olarak fonksiyon gösterebilen yeni çözünür faktörler keşfedilecektir. Gelecekte, tek bir plazma örneğinden elde edilen birçok biyobelirtecin entegrasyonu tedavinin optimize edilmesi ve kişiselleştirilmesi için klinik uygulamada güçlü bir araç olabilir.

KAYNAKLAR

1. **Zhang Y, Yang H, Yu J, Wei H.** Rapid and sensitive detection of HIV-1 p24 antigen by immunomagnetic separation coupled with catalytic fluorescent immunoassay. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408:6115-21. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9722-6>
2. **Bayraktar B.** HIV-virüsün genel özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2016; 9:1-5.
3. **Giri Setty MKH, Hewlett IK.** Point of care technologies for HIV. *AIDS Res Treat* 2014;497046. <https://doi.org/10.1155/2014/497046>
4. **Shafiee H, Wang S, Inci F, et al.** Emerging technologies for point-of-care management of HIV infection. *Annu Rev Med* 2015; 66:387-405. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-092112-143017>
5. **GBD 2015 HIV Collaborators, Wang H, Wolock TM, et al.** Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980-2015: the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet HIV* 2016; 3:e361-87.
6. **Dökmetaş İ, Hamidi AA.** HIV epidemiyoloji. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2016; 9:6-11.
7. <https://www.thsk.gov.tr/guncel/haberler/198-bulasici-hastaliklar-daire-baskanligi-haberler/dunya-aids-gunu.html> (Erişim tarihi: 16.01.2017)
8. **Figueroa C, Johnson C, Verster A, Baggaley R.** Attitudes and acceptability on HIV self-testing among key populations: A literature review. *AIDS Behav* 2015; 19:1949-65. <https://doi.org/10.1007/s10461-015-1097-8>
9. **Sargin F, Goktas S.** HIV prevalence among men who have sex with men in Istanbul. *Int J Infect Dis* 2017; 54:58-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.406>
10. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic: 2013. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Global_Report_2013_en_1.pdf (Erişim tarihi: 16.01.2017).
11. **Broz D, Wejnert C, Pham HT, et al.** HIV infection and risk, prevention, and testing behaviors among injecting drug users-National HIV Behavioral Surveillance System, 20 US Cities, 2009. *MMWR Surveill Summ* 2014; 63:1-51.
12. **Rosenberg NE, Pilcher CD, Busch MP, Cohen MS.** How can we better identify early HIV infections? *Curr Opin HIV AIDS* 2015; 10:61-8. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000121>
13. **Moyo S, Wilkinson E, Novitsky V, et al.** Identifying recent HIV infections: From serological assays to genomics. *Viruses* 2015; 7:5508-24. <https://doi.org/10.3390/v7102887>
14. **Mbachu II, Udigwe G, Joseph I, et al.** The evaluation of accuracy of serial rapid HIV test algorithm in the diagnosis of HIV antibodies among pregnant women in south east Nigeria. *BMC Res Notes* 2015; 8:557.
15. **Bentsen C, McLaughlin L, Mitchell E, et al.** Performance evaluation of the Bio-Rad Laboratories GS HIV Combo Ag/Ab EIA, a 4th generation HIV assay for the simultaneous detection of HIV p24 antigen and antibodies to HIV-1 (groups M and O) and HIV-2 in human serum or plasma. *J Clin Virol* 2011; 52(Suppl 1):S57-61. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.09.023>
16. **Spivak AM, Sydnor ER, Blankson JN, Gallant JE.** Seronegative HIV-1 infection: a review of the literature. *AIDS* 2010; 24:1407-14. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833ac65c>
17. Centers for Disease Control and Prevention Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations. https://www.cdc.gov/hiv/pdf/HIV_testingAlgorithmRecommendation-Final.pdf (Erişim tarihi: 16.01.2017)
18. Association of Public Health Laboratories. Suggested Reporting Language for the HIV Laboratory Diagnostic Testing Algorithm. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/22423> (Erişim tarihi: 16.01.2017).
19. **Kuşkucu MA, Midilli K.** HIV tanı ve direnç sorunu. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2016; 9:95-100.
20. http://thsk.saglik.gov.tr/eDosya/bulasici-hastaliklar-db/hiv_aids_tani_tedavi_rehberi_2013.pdf
21. **Abimiku A, Timperi R, Blattner W.** Laboratory innovation towards quality program sustainability. *Curr HIV/AIDS Rep* 2016; 13:202-8. <https://doi.org/10.1007/s11904-016-0323-y>
22. **Uzun N.** HIV enfeksiyonunun doğal seyri ve klinik özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2016; 9:17-21.
23. **Tuzuner U, Ozdemir M.** Laboratory algorithm in HIV infection diagnosis. *J HIV Clin Scientific Res* 2016; 3:7-10.
24. **Pavie J, Rachline A, Loze B, et al.** Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood: a real-time comparison in a healthcare setting. *PLoS One* 2010; 5:e11581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011581>
25. **Greenwald JL, Burstein GR, Pincus J, Branson B.** A rapid review of rapid HIV antibody tests. *Curr Infect Dis Rep* 2006; 8:125-31. <https://doi.org/10.1007/s11908-006-0008-6>
26. **Eller LA, Eller MA, Ouma BJ, et al.** Large-scale human immunodeficiency virus rapid test evaluation in a low prevalence Ugandan blood bank population. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3281-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.00894-07>
27. **Meles H, Tegbaru B, Messele T.** Evaluation of rapid assays for screening and confirming HIV-1 Infection in Ethiopia. *Ethiop Med J* 2002; 40(Suppl 1):S27-36.
28. **Koblavi-Dème S, Maurice C, Yavo D, et al.** Sensitivity and specificity of human immunodeficiency virus rapid serologic assays and testing algorithms in an antenatal clinic in Abidjan, Ivory Coast. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1808-12. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1808-1812.2001>
29. **Facente SN, Dowling T, Vittinghoff E, Sykes DL, Colfax GN.** False positive rate of rapid oral fluid HIV tests increases as kits near expiration date. *PLoS One* 2009; 4:e8217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008217>
30. **Obermeyer CM, Bott S, Bayer R, et al.** HIV testing and care in Burkina Faso, Kenya, Malawi and Uganda: ethics on the ground. *BMC Int Health Hum Rights* 2013; 13:6. <https://doi.org/10.1186/1472-698X-13-6>

31. **Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, et al.** Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2010; 304:321-33.
<https://doi.org/10.1001/jama.2010.1004>
32. **Noah C.** HIV testing. In: Hoffmann C, Rockstroh JK eds. HIV 2015/16. Hamburg: Medizin Fokus Verlag, 2015:15-21.
33. **Scott L, Noble L, Moloi J, Erasmus L, Venter WD, Stevens W.** An evaluation of the Abbott m2000 Real-Time HIV-1 assay for HIV viral load monitoring in South Africa compared with existing technologies: Roche COBAS Ampliprep/COBAS Amplicor; Roche COBAS Ampliprep/ COBAS TaqMan HIV-1, and BioMérieux NucliSENS EasyQ HIV-1. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2209-17.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01761-08>
34. **Midilli K.** Antiretroviral tedavi: Direncin moleküler tanısı ve klinik yansımaları. *ANKEM Derg* 2014; 28(Ek 2):E150-4.
35. <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv-guidelines/6/drug-resistance-testing> (Erişim tarihi: 25.03.2017)
36. **Yalçınkaya T, Köse Ş.** Antiretroviral tedavi almayan olgularda HIV-1 primer ilaç direnci mutasyonlarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:585-95.
<https://doi.org/10.5578/mb.8321>
37. **Kuskucu MA, Midilli K, Yemişen M, Abdelkareem A, Ergin S, Tabak F.** Transmitted drug resistance (TDR) prevalence among treatment naive HIV-1 infected patients in Istanbul remained unchanged between 2004 and 2015. 18th Annual Meeting of European Society for Clinical Virology, Edinburgh, İngiltere, 2015:256.
38. **Read JS, Committee on Pediatric AIDS.** Diagnosis of HIV-1 infection in children younger than 18 months in the United States. *Pediatrics* 2007; 120:e1547-62.
<https://doi.org/10.1542/peds.2007-2951>
39. <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/3/perinatal-guidelines/188/initial-postnatal-management-of-the-hiv-exposed-neonate> (Erişim tarihi: 25.03.2017)
40. **Celletti F, Sherman G, Mazanderani AH.** Early infant diagnosis of HIV: review of current and innovative practices. *Curr Opin HIV AIDS* 2017; 12:112-6.
41. <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/2/pediatric-arv-guidelines/55/diagnosis-of-hiv-infection-in-infants-and-children> (Erişim tarihi: 25.03.2017)
42. **Mete B.** Antiretroviral tedavi. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2016; 9:101-7.
43. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/prevention.html> (Erişim tarihi: 16.01.2017)
44. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/prep.html> (Erişim tarihi: 16.01.2017)
45. **Kaya S.** HIV enfeksiyonunun önlenmesi. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2016; 9:108-12.
46. <https://www.cdc.gov/hiv/risk/pep/index.html> (Erişim tarihi: 16.01.2017)
47. **Sayın-Kutlu S.** İnsan immün yetmezlik virusuna karşı profilaksi. *Klinik Dergi* 2016; 29:100-6.
48. <https://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/20/48/the-basics-of-hiv-prevention> (Erişim tarihi: 16.01.2017)
49. **Stephenson KE, D'Couto HT, Barouch DH.** New concepts in HIV-1 vaccine development. *Curr Opin Immunol* 2016; 41:39-46.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.011>
50. **Leeansyah E, Malone DF, Anthony DD, Sandberg JK.** Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities. *Curr Opin HIV AIDS* 2013; 8:117-24.
<https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32835c7134>
51. **Stacey AR, Norris PJ, Qin L, et al.** Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* 2009; 83:3719-33.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01844-08>
52. **Gay C, Dibben O, Anderson JA, et al.** Cross-sectional detection of acute HIV infection: timing of transmission, inflammation and antiretroviral therapy. *PLoS One* 2011; 6:e19617.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019617>
53. **Jiao Y, Zhang T, Wang R, et al.** Plasma IP-10 is associated with rapid disease progression in early HIV-1 infection. *Viral Immunol* 2012; 25:333-7.
<https://doi.org/10.1089/vim.2012.0011>
54. **Roberts L, Passmore JA, Williamson C, et al.** Plasma cytokine levels during & acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 2010; 24:819-31.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283367836>
55. **Griffin J, Moulton M, Elmezayen R, Jonathan M.** Negative immunomodulators-blunting immunostimulation and facilitating infection. In: Duc HT ed. "Immune Responce Activation" *InTech* 2014:105-20.
<https://doi.org/10.5772/57540>

Klinik Örneklerden ve Havadan İzole Edilen Küf Mantarlarının İn Vitro Virülans Faktörlerinin ve *Galleria mellonella* Larva Ölüm Hızlarının Karşılaştırılması[§]

Zemfira ALİYEVA*, Hatice ERDEM*, Ahmet Kamil KARAKUŞ**, Ayşe KALKANCI*

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

**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dönem III, Ankara

ÖZ

Amaç: Havada bulunan küfler fırsatçı mantar enfeksiyonlarının etkenidir. Fakat bu küflerin virülans özellikleri konusunda in vitro ve in vivo karşılaştırmalı çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada, hastalardan ve havadan izole edilen küflerin virülans özellikleri karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Toplam olarak 12 klinik izolat ve 14 hava izolatu kazein hidrolizi, fosfolipaz, esterez, DNAz üretimi, eskülin hidrolizi, katalaz aktivitesi ve salgısal aspartil proteinaz üretimi bakımından incelenmiştir. Bu küfler *Galleria mellonella* larvalarına enjekte edilerek enfeksiyon oluşturulmuştur. İn vitro virülans faktörleri ve in vivo mortaliteleri karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Farklı kaynaklardan elde edilen küflerin in vitro ve in vivo virülans özellikleri arasında bir fark gösterilememiştir.

Sonuç: Bu çalışmanın gerçek insan enfeksiyonundaki yansımaları değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: *Galleria mellonella*, havasal küfler, patojenik küfler, virülans

ABSTRACT

Comparative Evaluation of in Vitro Virulence of Mould Isolates from Clinical Cases and from Air Samples and Their Mortality Rates in *Galleria mellonella* Larvae

Objective: Air-borne moulds are the causative agents of opportunistic fungal infections. However limited number of in vitro and in vivo comparative studies have been performed about virulence features of these moulds. In this study, we compared the virulence features of different moulds isolated from patients and air samples.

Material and Methods: A total number of isolates from 12 clinical samples and 14 air-borne moulds were evaluated as for casein hydrolysis, phospholipase, esterase activities, DNase production, esculin hydrolysis, catalase activity and aspartyl proteinase production. *Galleria mellonella* larvae were infected with these clinical and air-borne moulds. In vitro virulence factors and in vivo mortalities were compared.

Results: We found no difference between in vitro and in vivo virulence features of the moulds isolated from different sources.

Conclusion: The projections of this study on human infections should be evaluated.

Keywords: *Galleria mellonella*, air-borne moulds, pathogenic moulds, virulence

GİRİŞ

Küf mantarları hava ve toprakta organik maddeler üzerinde yaşayan saprofit canlılardır. İnsanlarda enfeksiyon oluşturabilmeleri için solunum yolundan veya deriden temas yoluyla

alınmaları gerekir. Virülansları düşük olduğu için, dermatofitler dışındaki küf mantarlarının enfeksiyon oluşturabilmeleri konak faktörlerine bağlıdır. Küf mantarlarının sahip olduğu virülans faktörleri hücre dışı enzimleri, bazı toksinleri, melanin üretimleri, siderofor içermeleri,

Alındığı tarih: 23.11.2016

Kabul tarihi: 25.04.2017

Yazışma adresi: Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

Tel: 0312 202 46 20

e-posta: kalkanci@gazi.edu.tr

[§] Bu araştırma 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (16-20 Kasım 2016, Antalya) sunulmuştur.

hücre duvarındaki antijenik yapılar, konidyalarının şekli, solunum hücrelerine girebilme özellikleri ve konak faktörlerine gösterdikleri dirençtir⁽¹⁻³⁾. Küf mantarlarının in vitro virülans özelliklerinin irdelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Solunum yolundan patojen olan küflerin konak immün yanıtını aşabilmelerini hangi virülans faktörlerinin sağladığı tam olarak bilinmemektedir. Ortam havasında daha çok *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* cinsi küf mantarları bulunur. Ancak, enfeksiyon etkeni küfler daha çok *Aspergillus* cinsi ve *Mucoromycotina* üyeleridir⁽⁴⁾. Havadan izole edilen bir *Aspergillus* kökeni ile enfeksiyon etkeni olan bir başka *Aspergillus* kökeni arasındaki virülans farkının araştırıldığı az sayıda yayın bulunmaktadır⁽¹⁾. Mantarların virülans faktörleri genellikle maya mantarları ve en çok da *Candida* cinsi ile çalışılmıştır⁽⁵⁾. Hayvan modelleri ile yapılan in vivo çalışma sayısı ise daha da azdır⁽⁶⁾. Etik kurallar ve maliyet nedeniyle memelilerde hayvan modellerinin oluşturulması konusunda sınırlamalar bulunmaktadır. *Galleria mellonella* mum güvesidir. Larvaları son yıllarda virülansın araştırılmasında model olarak kullanılmaya başlanmıştır⁽⁷⁾.

Bu çalışmanın amacı, havadan ve klinik örneklerden izole edilen küf mantarlarının in vivo ve in vitro virülans özelliklerinin karşılaştırılmasıdır. Çalışmanın iki basamağı bulunmaktadır. Birinci basamakta, küf kökenlerinin in vitro virülans faktörleri uygun besiyerlerinde araştırılmıştır. İkinci basamakta, kökenler ile *Galleria mellonella* larvalarında oluşturulan enfeksiyonun larvaları öldürme hızı hesaplanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tür düzeyinde tanımlama morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır. Bu nedenle tür isimleri “tür kompleksi” olarak anlaşılmalıdır.

Klinik kökenler ve izolasyon kaynağı (12 adet)

Aspergillus fumigati (3 adet pnömoni etkeni), *Aspergillus fumigati* (sinüzit), *Aspergillus fumigati* (keratit), *Aspergillus terreus* (keratit), *Fusarium solani* (keratit), *Fusarium oxysporum* (keratit), *Paecilomyces lilacinus* (kan), *Paecilomyces variotii* (keratit), *Alternaria alternata* (keratit), *Rhizopus oryzae* (sinüzit).

Havadan izole edilen kökenler (14 adet)

Hastane içi havadan, petri açılması yöntemi ile izole edilen *Penicillium citrinum* (3 adet), *Penicillium crysogenum* (1 adet), *Cladosporium cladosporoides* (4 adet), *Aspergillus nigri* (2 adet), *Aspergillus flavi* (1 adet), *Mucor* sp. (1 adet), *Ulocladium* spp. (2 adet).

İn vitro virülans çalışmaları

Bütün kökenlerin in vitro virülans faktörü olarak kazein hidrolizi, fosfolipaz üretimi, esteraz aktivitesi, DNaz varlığı, eskülin hidrolizi, katalaz aktivitesi ve salgısal asid proteinaz (SAP) aktivitesi araştırılmıştır. Her bir küf kolonisinden hazırlanan süspansiyondan 10 µl plaklara inoküle edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır.

Kazein hidrolizi için %3 süt tozu içeren Mueller Hinton Agar (MHA, Difco) plakları hazırlanmıştır. Plaklar 37°C’de 24 saat bekletilmiş, koloni etrafındaki şeffaf zon varlığı kazeinaz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir⁽⁸⁾. Fosfolipaz üretimi yumurta sarılı Sabouraud Dekstroz Agar (SDA, Difco) besiyerinde (13.0 g; NaCl (Sigma), 11.7 g; CaCl₂ (Sigma), 0.11 g; and %10 steril egg yolk emülsiyonu (Sigma), 184 mL of distile su) incelenmiştir. Plaklar 37°C’de 72 saat bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. Fosfolipaz aktivitesi koloni etrafında görülebilir bir zon oluşması olarak kabul edilmiştir⁽⁹⁾. Esteraz aktivitesi Tween 80 opasite test besiyeri kullanılarak

incelenmiştir [10 g bakteriyolojik pepton (Sigma), 5 g sodyum klorid (Sigma), 0.1 g kalsiyum klorid (Sigma), 15 g agar (Difco), 1000 mL distile su]. Steril karışım 50 C sıcaklığa soğuduğunda steril Tween 80 (Merck, Almanya) 5 mL eklenmiştir. Besiyeri 30 C’de 10 gün bekletilmiştir. Besiyeri etrafında zon oluşması pozitif kabul edilmiştir⁽¹⁰⁾. DNAaz aktivitesi 1957 yılında Jeffries, Holtman ve Guse tarafından⁽¹¹⁾ tanımlanan yöntemin esas alındığı hazır DNAz besiyeri kullanılarak incelenmiştir⁽¹²⁾. Eskülin hidrolizi için safra-eskülin agar plakları hazırlanmıştır⁽¹³⁾. Koloniler 35 C’de 18 saat sonra koyu renk oluşumu açısından incelenmiştir⁽¹⁴⁾. Katalaz aktivitesi lam üzerinde %3’l k hidrojen peroksit ile koloni karıştırıldığında oksijen baloncuklarının oluşması ile gösterilmiştir⁽¹⁵⁾. Proteinaz aktivitesi Staib⁽¹⁶⁾ tarafından tanımlandığı şekilde sığır serum albümini (BSA, Sigma) içeren agar plaklarında araştırılmıştır. BSA agar plakları, %2 glukoz (Sigma), %0.01 KH₂PO₄ (Sigma), %0.05 MgSO₄ (Sigma), %2 agar ve %1 BSA (Sigma) eklenerek hazırlanmıştır. Plaklar 37 C’de 3. gün bekletilmiş, koloninin çevresinde halo oluşmasıyla değerlendirilmiştir⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

 n vivo *Galleria mellonella* modeli:⁽²⁰⁾

Galleria mellonella larvaları, cam kavanozlarda, yarı sentetik besin kullanılarak 28 C 2 C, %60 5 bağıl neme sahip karanlık laboratuvar ortamında yetiştirilmiştir. Stok kültürün devamlığı *G. mellonella* ergin dişi ve erkek böceklerin çiftleşmeleri sonucu, besin konulan kavanozlara dişilerin bıraktığı yumurtaların açılması sonucu sağlanmıştır. Besin bileşenlerinden kepek, gliserin, bal ve su bir kap içine konulmuş ve iyice homojen bir hâle gelinceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışıma balmumu hâlinde ilave edilerek karışım homojenliği sağlanmıştır. 100 g yarı sentetik besiyeri için buğday unu (22 g), buğday kepeği (22 g), süt tozu (11 g), ekmek mayası (5.5 g), balmumu (17.5 g),

gliserin (11 ml) ve bal (11 ml) kullanılmıştır.

Her kökenden serum fizyolojik (SF) içinde hazırlanan süspansiyon 5x10⁸ hücre içerecek şekilde sulandırılmıştır. S spansiyondan 10  l Hamilton enjektörü içine alınmıştır. Her gruptaki 10 larva son sol bacak  n nden hemolenf içine yapılan enjeksiyon ile inokule edilmiştir. Larvalar 30 C’de 12 gün bekletilmiş ve her gün canlı larva sayısı kayıt edilmiştir. Ellenmemiş bir kontrol grubu, 10  l SF verilen bir kontrol grubu ve enjektörün batırılıp çıkarıldığı bir kontrol grubu çalışmaya eklenmiştir (şekil 1). Canlı kalan larva sayıları esas alınarak Kaplan-Meier grafikleri çizilmiştir. Her grupta 10 larva olmak üzere, 14 hava k f , 12 klinik köken, 3 kontrol grubu (29 ayrı grup) için, 290 larva kullanılmıştır.

Sonuc ların analiz yöntemi

Nedensellik ilişkilerinin irdelemesine göre araştırmalar tanımlayıcı ve çözümleyici araştırmalar olarak ayrılırlar. Çalışmamız “tanımlayıcı” araştırma olarak sınıflandırılmalıdır. Tanımlayıcı  alışmalar esasen olgu raporları veya olgu serileridir.

Çalışmamız farklı k f mantarlarından oluşan bir küme olarak kabul edilmelidir. Farklı k fleri içermesi nedeniyle cinsler veya t rl r arası istatistiksel bir karışılaştırma yapılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle her küfün kendi virülans özelliği kendi içinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Hastalardan izole edilen 12 k f ile havadan izole edilen 14 k f kazein, fosfolipaz, esteraz, DNAz, eskülin hidrolizi, katalaz, SAP varlığı açısından karışılaştırılmıştır. Sonuc lar Tablo 1’de sunulmuştur. Virülans faktörleri esasen t rl re ait bir özellik olduğu için ve t rl r arası karışılaştırma yapılması gerekir. Ancak, her grupta istatistiksel

Tablo 1. Hastalardan ve havadan izole edilen küf mantarlarının virülans faktörleri.

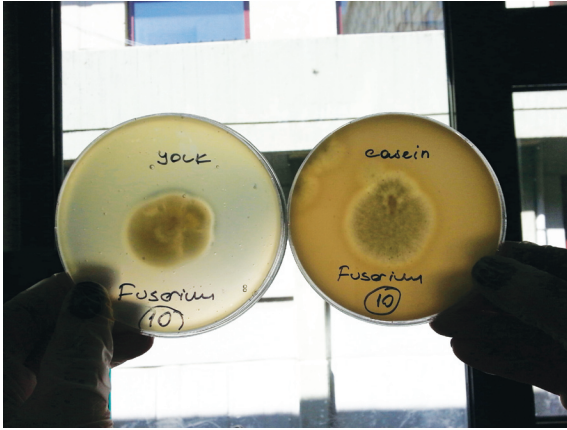
	Hastalardan izole edilen küfler						
	Kazein	Fosfolipaz	Esteraz	DNAz	Eskülin	Katalaz	SAP
<i>Aspergillus fumigati</i> (pnömoni)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (pnömoni)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (pnömoni)	+	-	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (sinüzit)	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (keratit)	-	-	+	-	+	-	-
<i>Aspergillus terreus</i> (keratit)	+	+	+	-	+	+	+
<i>Fusarium solani</i> (keratit)	-	-	+	-	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (keratit)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (kan)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Paecilomyces variotii</i> (keratit)	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alternaria alternata</i> (keratit)	+	+	-	-	+	+	+
<i>Rhizopus oryzae</i> (sinüzit)	-	+	-	-	+	+	-
	Havadan izole edilen küfler						
	Kazein	Fosfolipaz	Esteraz	DNAz	Eskülin	Katalaz	SAP
<i>Penicillium citrinum</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+	-	+	-	+	-	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus nigri</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>Aspergillus nigri</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>Aspergillus flavi</i>	+	-	-	+	+	-	-
<i>Ulocladium</i> sp.	+	-	-	+	+	+	-
<i>Ulocladium</i> sp.	+	-	-	-	+	+	-
<i>Mucor</i> sp.	-	-	-	-	+	+	-

karşılaştırma yapacak düzeyde aynı türe ait köken bulunmamaktadır. Bu nedenle her kökenin in vitro virülans özelliği in vivo virülansı ile karşılaştırılmıştır. İn vivo virülans özelliği *G. mellonella* larvalarını öldürme güçleri üzerinden değerlendirilmiştir.

İn vitro virülansı en yüksek olan iki köken yedi virülans faktörü de pozitif olan sinüzit etkeni bir *A. fumigati* ile keratit etkeni bir *Paecilomyces variotii*'dir. İncelenen yedi virülans faktöründen altısı pozitif olan keratit etkeni *A. terreus*'dur. İncelenen yedi virülans faktöründen beşi pozitif olan hasta izolatları pnömoni etkeni üç *A. fumigati* kökeni, keratit etkeni *F. solani*, kan izolatı *P. lilacinus* ve keratit etkeni *A. alternata* kökenidir. Üç virülans faktörü pozitif olan sinüzit etkeni *R. oryzae*, iki faktör pozitif olan keratit etkenleri olan *A. fumigati* ile *F. solani*'dir.

Virülansı en yüksek kökenler sistemik infeksiyon etkeni kökenler değildir. İn vitro virülans faktörü içermek ile sistemik enfeksiyon etkeni olmak arasında ilişki gösterilememiştir.

Havadan izole edilen küf kökenlerinden incelenen yedi faktörün yedisine ve altısına sahip olan köken bulunmamaktadır. En yüksek in vitro virülans faktörüne sahip olan beş faktör ile iki *P. citrinum* kökeni ve iki *A. nigri* kökenidir. Dört virülans faktörüne sahip kökenler bir *P. citrinum*, bir *C. cladosporoides*, bir *Ulocladium* sp. kökenidir. Üç virülans faktörüne sahip olanlar *P. chrysogenum*, *A. flavi* ve *Ulocladium* sp. kökenidir. İki virülans faktörüne sahip olan *Mucor* sp. kökeni, tek faktör olarak yalnızca eskülin hidrolizi özelliği olan *C. cladosporoides* kökenleridir.

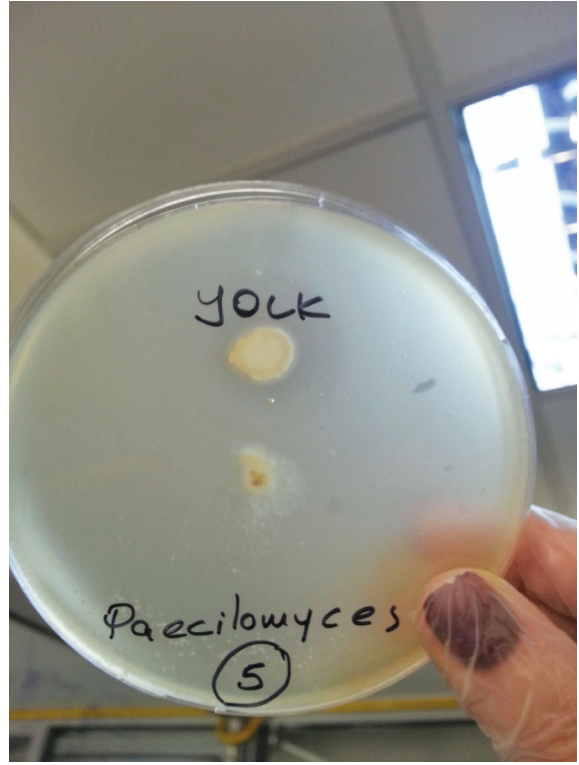


Resim 1. *Fusarium* kolonisinin Yolk agar ve kazein agardaki görünümü.



Resim 2. *Aspergillus terreus*'un Tween 80 opasite testi.

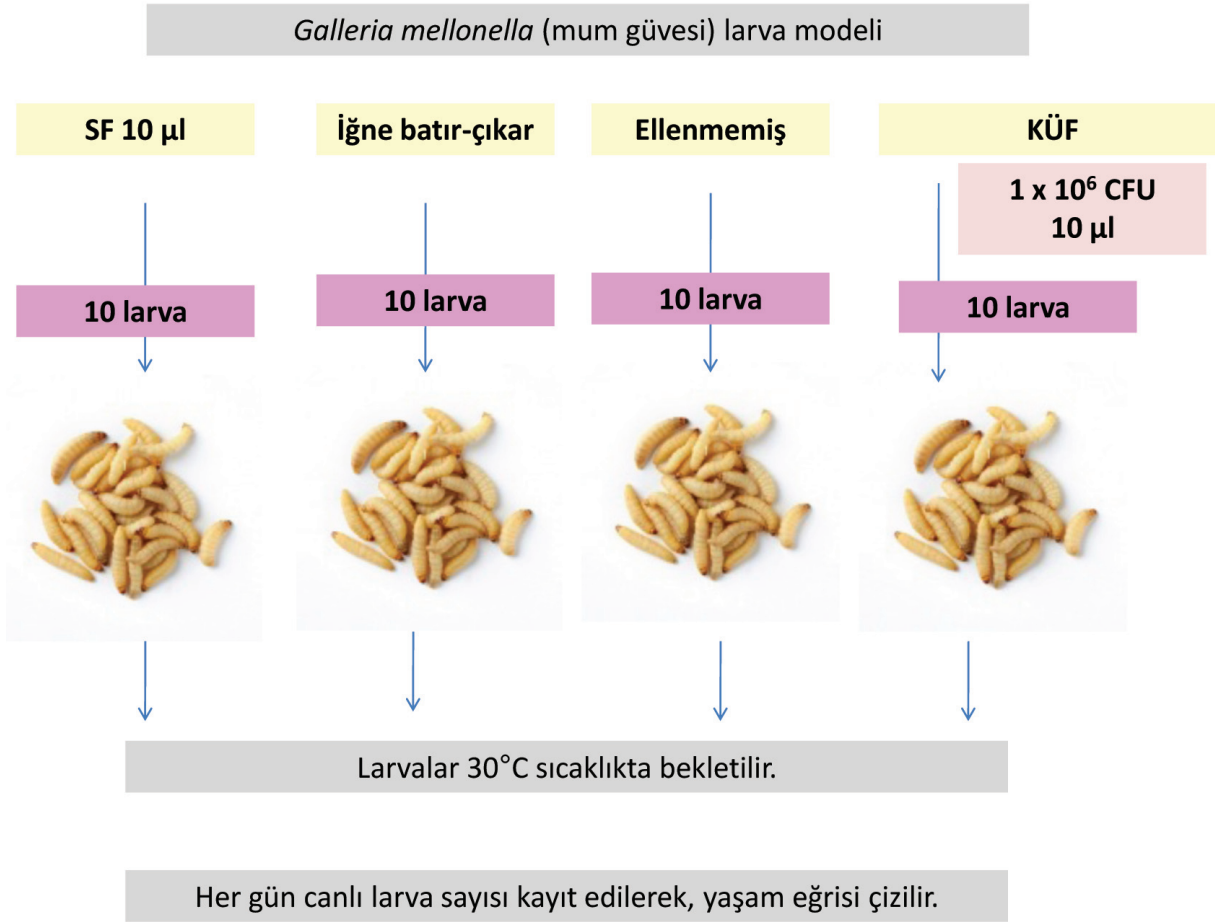
 n vitro virülans özelliği düşük olan *Mucor* kökeni, hava  rneği olarak izole edilen cinsler arasında en sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir. *Penicillium* cinsi ise enfeksiyon etkeni olarak neredeyse hiç izole edilmemekle birlikte,  n vitro virülans özelliği diğer havasal küflerden yüksek bulunmuştur. Az köken olması nedeniyle kesin bir yargıya varılamamakla birlikte, havadan izole edilen kökenler için  n vitro



Resim 3. *Paecilomyces* kolonisinin Yolk agardaki görünümü.

virülansın önemli bir faktör olmadığı d   t n lm  t r.

Bu çalışmanın  n vivo bölümünde 12 klinik köken ile 14 hava  rneği larvalara verilmiştir. Larvalar 12 gün boyunca takip edilmiştir. Her grupta 10 larva bulunmaktadır. Ya amda kalan larva sayıları esas alınarak Kaplan-Meier grafikleri çizilmiştir.  n vivo virülans  n yüksek kökenler hastalardan izole edilen keratit etkeni *F. solani* ve *A. terreus* kökenleri ile hava örneğinden izole edilen *Ulocladium* sp. ve *Mucor* sp. kökenleridir. Bu kökenlerin  n vitro virülans faktörü kapasiteleri ile  n vivo öldürme güçleri uyumlu bulunmamıştır.  n vivo virülans  n düşük olan kökenler havadan izole edilen *Cladosporium* kökenleri, *Penicillium* kökenleri ve *A. nigri* kökenleridir. Hastalardan izole edilen kökenler ile oluşturulan larva enfeksiyonunda 12 günde az sayıda larva canlı kalmıştır. Canlı larva kalan kökenler *Paecilomyces* kökenleri, *Aspergillus*'un keratit ve sinüzitis etkenleri



Şekil 1.

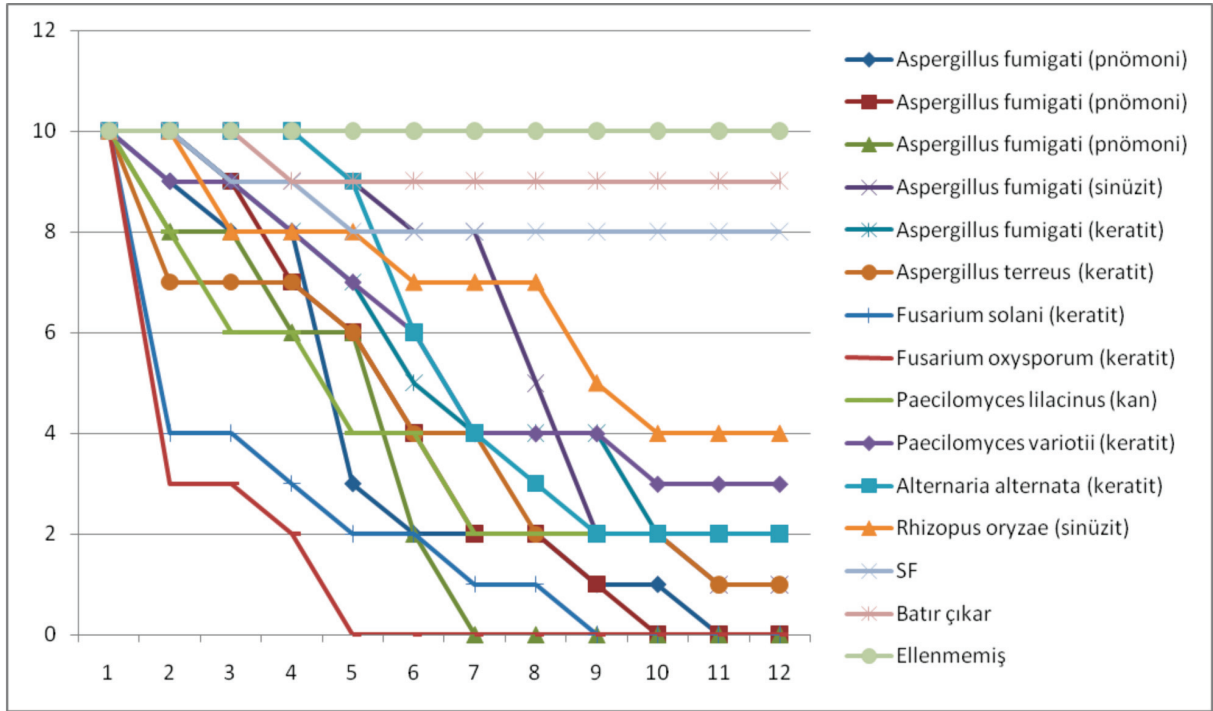
Alternaria ve *Rhizopus* kökenidir. Bu düşük in vivo virülans gösteren kökenler in vitro virülans faktörü bakımından güçlü kökenlerdir. Burada da yine in vitro virülans ve in vivo virülans uyumlu bulunmamıştır.

TARTIŞMA

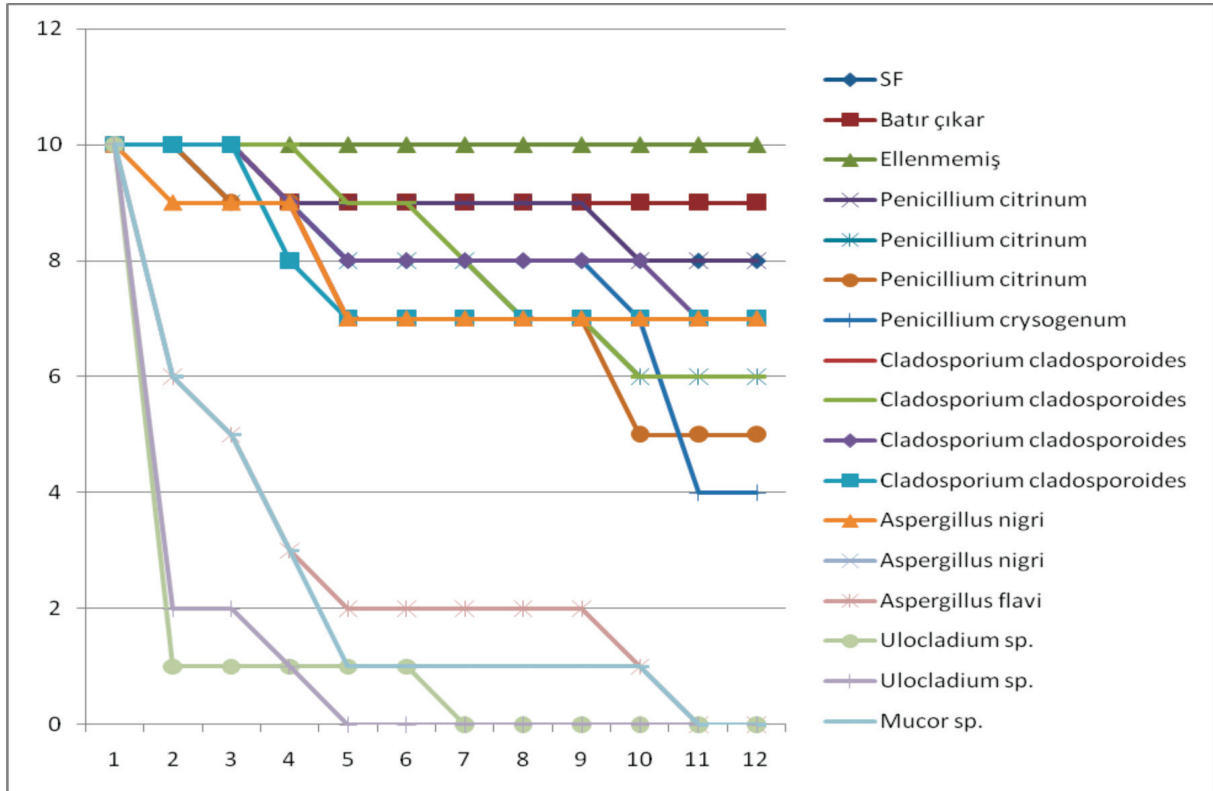
Mantar enfeksiyonlarında patogenezin temelinde mantara ait olan virülans özellikleri yanında konağın bağışık durumu da yer almaktadır. Doğada bulunan ve virülansı çok düşük olan Mucoromycotina alt şubesine ait mantarlardan *Mucor*, *Rhizopus* gibi cinsler, uygun konakta öldürücü enfeksiyonlara yol açarlar. Virülans özellikleri bugüne kadar çok ayrıntılı şekilde çalışılmamış olan ve havada bol bulunan *Alternaria*, *Penicillium* ve *Cladosporium* gibi

cinsler ise çok nadiren enfeksiyon etkenidir. Ancak çok düşük konaklarda etken olarak izole edilmişlerdir⁽²¹⁾.

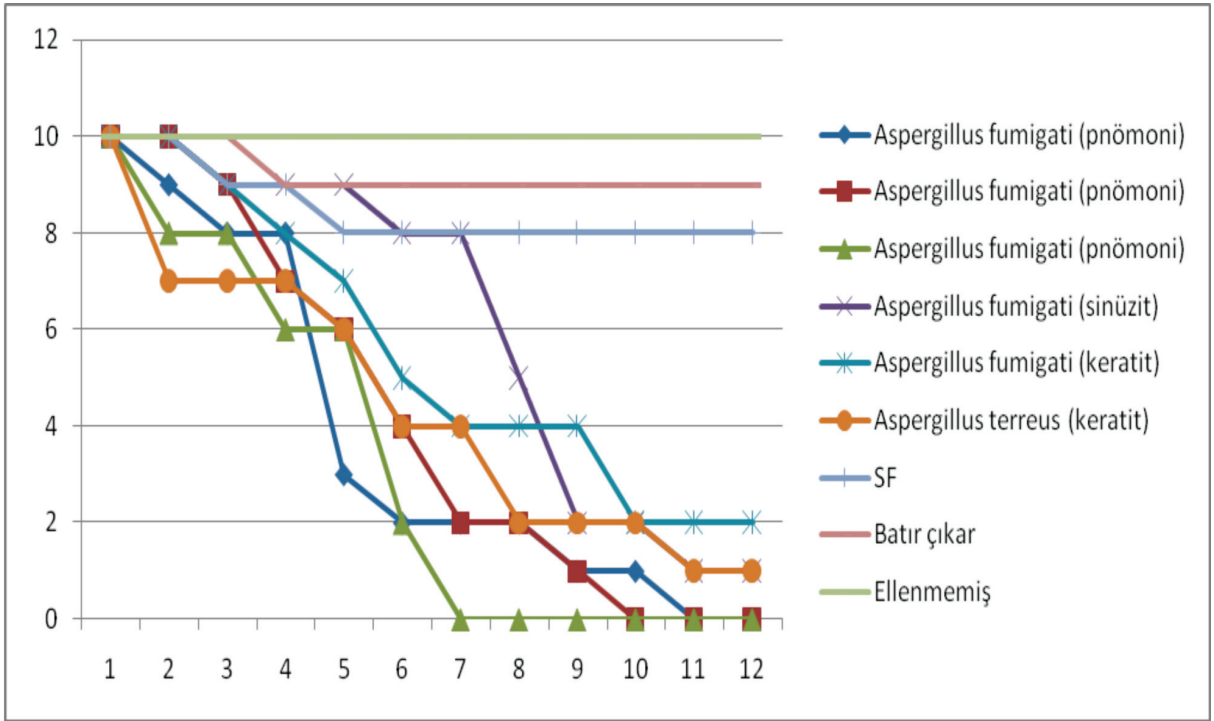
Çalışmamızda hastalardan izole edilen küf kökenlerinde belirgin bir virülans yüksekliği gösterilememiştir. Aynı şekilde, havadan izole edilen kökenler için de virülans düşüklüğüne dair kanıt elde edilememiştir. İn vivo virülans ile in vitro virülans arasında da uyumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu sonuçlar bize küf mantarlarının enfeksiyon etkeni olabilmesinde içerdikleri virülans faktörlerinden çok, konak faktörlerinin önemli olduğunu düşündürmektedir. Maya mantarlarından *Candida*'lar ile yapılan virülans çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Virülansı yüksek kökenlerin sistemik enfeksiyon, düşük kökenlerin lokal enfeksiyon oluşturma



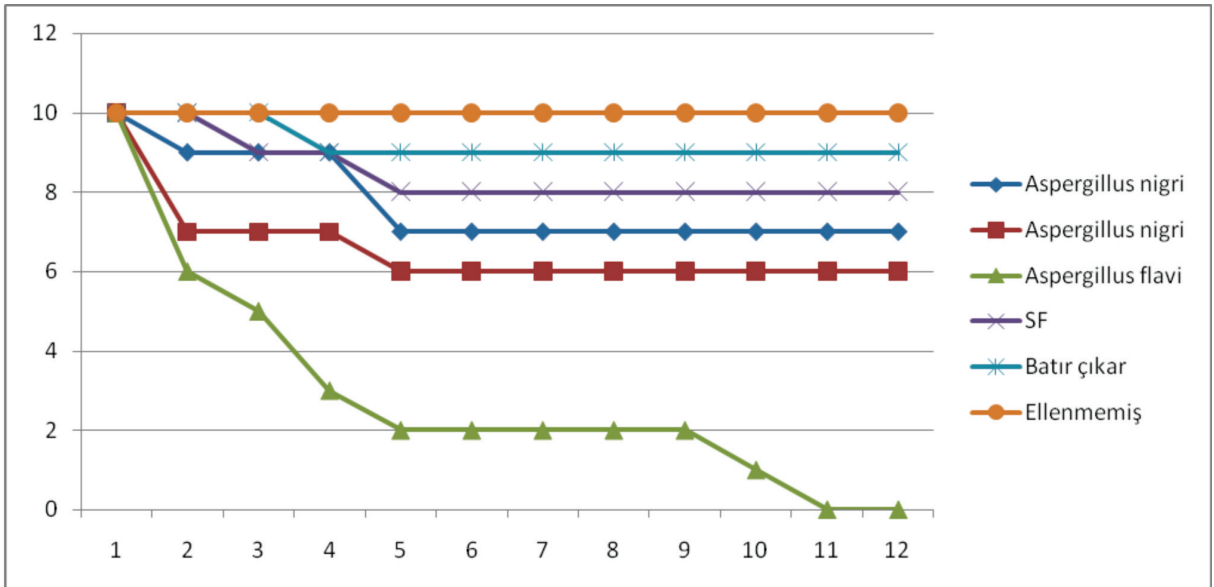
Grafik 1. Hasta örneklerinin Kaplan-Meier grafiği.



Grafik 2. Hava örneklerinin Kaplan-Meier grafiği



Grafik 3. Hastalardan izole edilen *Aspergillus* kökenlerinin Kaplan-Meier grafiği.



Grafik 4. Havadan izole edilen *Aspergillus* kökenlerinin Kaplan-Meier grafiği.

duğu gösterilmiştir⁽²²⁾. Maya mantarları ile oluşan enfeksiyonlarda konak faktörleri de çok önemlidir⁽³⁾. Ancak mantarlara ait virülans faktörlerinin de patogeneze önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, incelediğimiz in vitro virülans faktörleri kazein hidrolizi, fosfolipaz, esterase, DNaz, katalaz ve SAP varlığı ile eskülin hidrolizidir. Bu faktörler daha önce küf mantarlarını içeren geniş gruplarda çalışılmamıştır. Bu nedenle, elde ettiğimiz sonuçlar başka çalışmalar ile

karşılaştırılamamıştır. Küf mantarlarından *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Mucor* cinsi gibi insanlarda sık enfeksiyon etkeni olan cinslerin virülans özellikleri daha çok bilinmektedir.

Sav ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ yaptıkları yeni tarihli bir çalışmada, göz enfeksiyonlarından izole edilen 14 *Aspergillus* kökeninden bir tanesinde proteinaz üretimi pozitif bulunurken, fosfolipaz üretimi tamamında negatif bulunmuştur. Bizim *A. fumigati* kökenlerimizden biri hariç hepsi fosfolipaz pozitif, *A. nigri* kökenlerimiz fosfolipaz negatif, *A. flavi* proteinaz negatif, *A. nigri* kökenleri proteinaz pozitif bulunmuştur. Sav ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ çalışmasında, 12 *Fusarium* kökeninden 5'inde proteinaz aktivitesi pozitif ve tamamında fosfolipaz aktivitesi pozitif bulunmuştur. Bizim *Fusarium* kökenleri fosfolipaz negatif iken, *F. solani* proteinaz negatif, *F. oxysporum* pozitif bulunmuştur. Her iki tür için de iki çalışmada kısmen farklı sonuçlar elde edilmiştir. *Fusarium* cinsi küflerin virülans faktörleri sınırlı sayıda çalışmada konu edilmiştir. Fosfolipaz ve esteraz ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, *Fusarium* kökenlerinden fosfolipaz aktivitesi fazla olanın esteraz aktivitesinin azaldığı, tersine esteraz fazla olanın da fosfolipaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir⁽²³⁾. Bu durumda, virülans türden çok, kökenler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu sonuç, Sav ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ çalışmasında elde ettikleri sonuçlar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların farklı olmasını açıklayabilir.

Aspergillus cinsi küflerin virülans faktörleri gliotoksin üretimi, katalaz aktivitesi, fagositoz sonrası makrofaj içinde canlı kalabilme özelliğidir⁽²⁴⁾. Fosfolipaz üretimi in vitro virülans faktörü olarak bazı çalışmalarda incelenmiştir. 2004 tarihli bir çalışmada, *Aspergillus* cinsine ait çevresel ve klinik kökenler fosfolipaz üretimi bakımından karşılaştırılmış ve bütün kökenler fosfolipaz pozitif bulunmuştur. Fosfolipaz C'nin klinik kökenlerde daha fazla üretiliyor olması nedeniyle, A ve B'den daha

fazla aspergilloz patogeneze katılmış olabilecekleri vurgulanmıştır⁽²⁵⁾.

Ülkemizden yapılan Alp ve ark.'nın⁽²⁶⁾ çalışmasında, çeşitli tür komplekslerine ait 73 *Aspergillus* kökeni elastaz, asit proteinaz ve fosfolipaz açısından incelenmiştir. Elastaz aktivitesi *A. fumigatus* kökenlerinin % 95.6'sında, *A. flavus* kökenlerinin % 82.6'sında pozitif ve *A. niger* kökenlerinde negatif bulunmuştur. Asit proteinaz aktivitesi ise 45 *A. fumigatus* kökeninden 20 tanesinde pozitif bulunmuştur. Bütün *A. fumigatus* kökenleri fosfolipaz pozitif iken, *A. flavus* ve *A. niger* negatif bulunmuştur⁽²⁶⁾. Çalışmamızda, yüzde hesaplamaya yetecek sayıda köken bulunmadığı için tam bir karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak iki çalışma sonuçlarına bakıldığında, *Aspergillus* cinsi içinde esteraz, fosfolipaz ve proteinaz üretiminin kökenler arasında değişken olabileceği görülmektedir.

Ülkemizden yapılan bir başka çalışmada, *Aspergillus* kökenleri asit proteinaz ve fosfolipaz üretimi açısından incelenmiştir. Test edilen 30 *A. fumigatus* kökeninden 23 tanesinde asit proteinaz, 28 tanesinde fosfolipaz pozitifliği bulunmuştur. *A. flavus* kökenlerinden hiç birinde proteinaz ve fosfolipaz gösterilememiştir. Test edilen 4 *A. niger* kökeninden hiçbirinde asit proteinaz görülmezken, bir tanesinde fosfolipaz pozitif bulunmuştur⁽¹⁹⁾.

Çalışmamızda, temel hipotezimiz, çevresel küf örnekleri ile hastalardan elde edilen örnekler arasında virülans farkı olduğunun gösterilmesidir. Ancak hipotezimiz doğrulanamamıştır. Yani çevresel küf kökenlerinin daha düşük virülansa sahip oldukları gösterilememiştir. Bu çalışmanın en önemli özgün değerini larva modeli oluşturmaktadır. Larvalarda oluşturulan küf enfeksiyonlarında etken olan çevresel ve klinik kökenler arasında öldürme gücü bakımından bir fark olmadığı ilk kez gösterilmiştir. Bir önceki çalışmamızda, *Fusarium* ve *A. terreus* kullanarak

oluşturduğumuz larva modellerinden elde edilen in vivo virülans sonuçları ile bu çalışmamızda aynı etkenler için elde ettiğimiz sonuçlar benzer bulunmuştur⁽²⁰⁾.

Sonuç olarak, farklı cins ve türlerde küf mantarları ile yapılan çalışmalardan elde edilen farklı yüzdelere bulunmaktadır. Küf mantarlarının virülans özellikleri kökenler arasında değişken olabilir. Hastalık oluşması için gerekli temel virülans faktörleri konağa uyumluluk, bağışık sisteme ait mekanizmalardan kurtulabilme ve konağın mantarı öldürme gücüne karşı direnebilmektir. Küf mantarları ancak düşük konaklarda sistemik enfeksiyon oluşturabilirler. Patogeneze konağa ait faktörler küfe ait faktörlerden daha önemli olmaktadır. Bu bakımdan normal floramızda yer almaları nedeniyle endojen enfeksiyon oluşturan maya mantarlarının patogenezi küflerden bütünüyle farklıdır.

KAYNAKLAR

1. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol* 2017; 10:296-322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>
2. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol* 2010; 12:1535-43. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01517.x>
3. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:469-88.
4. Kasprzyk I. Aeromycology-main research fields of interest during the last 25 years. *Ann Agric Environ Med* 2008; 15:1-7.
5. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, et al. *Candida albicans* pathogenesis: Fitting within the host-microbe damage response framework. *Infect Immun* 2016; 84:2724-39. <https://doi.org/10.1128/IAI.00469-16>
6. de Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7:324-9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.001>
7. Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832:1378-83. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.008>
8. Ortiz GE, Noseda DG, Ponce Mora MC, Recupero MN, Blasco M, Albertó E. A comparative study of new *Aspergillus* strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. *Enzyme Res* 2016; 2016:3016149. <https://doi.org/10.1155/2016/3016149>
9. Ellepola AN, Samaranayake LP, Khan ZU. Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Braz J Microbiol* 2016; 47:911-6. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.009>
10. Fatahinia M, Poormohamadi F, Zarei Mahmoudabadi A. Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8:e20893. <https://doi.org/10.5812/jjm.20893>
11. Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* 1957; 73:590-1.
12. de Paula Menezes R, de Melo Riceto ÉB, Borges AS, de Brito Röder DV, dos Santos Pedrosa R. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Arch Oral Biol* 2016; 66:61-5. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.004>
13. Edberg SC, Trepeta RW, Kontnick CM, Torres AR. Measurement of active constitutive beta-D-glucosidase (esculinase) in the presence of sodium desoxycholate. *J Clin Microbiol* 1985; 21:363-5.
14. Edberg SC, Chaskes SJ, Altire-Werber E, Singer JM. Esculin-based medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1980; 12:332-5.
15. Chester B, Moskowitz LB. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1987; 25:439-41.
16. Staib F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965; 4:187-93. <https://doi.org/10.1080/00362176685190421>
17. Shirkhani S, Sepahvand A, Mirzaee M, Anbari K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. *J Mycol Med* 2016; 26:255-60. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.05.001>
18. Sav H, Ozdemir HG, Altınbas R, Kiraz N, İlkit M, Seyedmousavi S. Virulence attributes and antifungal susceptibility profile of opportunistic fungi isolated from ophthalmic infections. *Mycopathologia* 2016; 181:653-61. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0018-3>
19. Birinci A, Bilgin K, Tanrıverdi Çaycı Y. Klinik *Aspergillus* spp. izolatlarında virülans faktörü olarak asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:491-4. <https://doi.org/10.5578/mb.7782>
20. Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, Altay A, Aliyeva Z, Bozdayı G, Çağlar K. Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:366-76. <https://doi.org/10.5578/mb.9701>

21. Ruangritchankul K, Chindamporn A, Worasilchai N, Poumsuk U, Keelawat S, Bychkov A. Invasive fungal disease in university hospital: a PCR-based study of autopsy cases. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:14840-52.
22. Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr Opin Microbiol* 2016; 32:89-95.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.010>
23. Ishida K, Alviano DS, Silva BG, et al. Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45:411-6.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500034>
24. Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvaney NG. Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors. *Mycopathologia* 2014; 178:363-70.
<https://doi.org/10.1007/s11046-014-9768-y>
25. Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2004; 42:81-6.
<https://doi.org/10.1080/13693780310001610029>
26. Alp S, Arikian S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microbiol* 2008; 48:331-7.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200700349>

Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Saptanmasında Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Kullanımı

Tayfun DEMİRAY*, Özlem AYDEMİR*, Ümit KILIÇ**, Kerem YILMAZ**, Mehmet KÖROĞLU**, Mustafa ALTINDİŞ**

*Sakarya Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya

**Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Sakarya

ÖZ

Amaç: Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en güncel sağlık sorunlarından biridir. Karbapenem dirençli *Klebsiella* türlerinin neden olduğu salgınlar ve sporadik olgular ülkemizde giderek artan sıklıkta rapor edilme-ye başlanmıştır. Bu çalışmada, moleküler metot ile karbapenemaz ürettiği doğrulanmış *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz inaktivasyon testinin tanınal değerinin modifiye Hodge testi ile kıyaslanması ve rutin laboratuvar pratiğinde kullanımının irdelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hastanemizdeki 2014-2015 yılları arasında klinik örneklerden ve tarama numunelerinden izole edilen toplam 125 *Klebsiella pneumoniae* izolatı çalışma kapsamında değerlendirildi. Modifiye Hodge testi ve karbapenemaz inaktivasyon testinin değerlendirilmesi için karbapenemaz üreten karbapenem dirençli 60 izolat ve karbapenem duyarlı 60 izolat kullanıldı. Moleküler değerlendirme Gene-Xpert® sistemine ait Carba R kitleri (Cepheid, ABD) ile *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM} gen bölgeleri araştırılarak yapıldı.

Bulgular: Moleküler yöntem ile karbapenemaz kodlayan gen varlığı saptanan 60 *Klebsiella* izolatında modifiye Hodge testi ile 54 adet izolatta pozitif sonuç saptanırken, karbapenemaz inaktivasyon testinde 52 adet izolatta pozitiflik saptandı.

Sonuç: Moleküler yöntem altın standart olarak değerlendirildiğinde; modifiye Hodge testinin ve karbapenemaz inaktivasyon testlerinin duyarlılıkları sırasıyla 0.85 ve 0.80, özgüllükleri ise 0.95 ve 0.93 olarak hesaplanmıştır. Enzim inhibisyonuna bağlı fenotipik testler düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmaları nedeniyle rutin uygulamalarda tercih edilebilmektedirler. Ancak bu testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin değişken olduğu unutulmamalıdır.

Anahtar kelimeler: Karbapenemaz inaktivasyon testi, karbapenemazlar, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Use of Carbapenemase Inactivation Test in the Detection of Carbapenemase Production Among The Isolates of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*

Objective: The infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates are among the most actual health problems in our country as well as all over the world. Epidemics and sporadic cases caused by carbapenem-resistant *Klebsiella* species have begun to be reported increasingly from our country. In this study, we aimed to compare the diagnostic value of carbapenemase inactivation test with the modified Hodge test in carbapenemase producing *K. pneumoniae* isolates verified by molecular method and to evaluate the use of this test in routine laboratory practice.

Material and Methods: A total of 125 isolates of *Klebsiella pneumoniae* harvested from clinical, and screening specimens between 2014 and 2015 were evaluated. Carbapenemase-producing 60, and carbapenem sensitive 60 isolates were used for the evaluation of the modified Hodge test and carbapenemase inactivation test. Molecular evaluation was performed by investigating the *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{VIM} gene regions with Carba R kits (Cepheid, USA) of the Gene-Xpert® system.

Results: The modified Hodge test detected 54 out of 60 *Klebsiella* isolates, which were found to have carbapenemase encoding gene by molecular method; whereas carbapenemase inactivation test detected 52 out of 60 isolates.

Conclusion: When molecular method is regarded as gold standard, sensitivities of modified Hodge test and carbapenemase inactivation test were 0.85 and 0.80; specificities were calculated as 0.95 and 0.93, respectively. Phenotypic tests depending on enzyme inhibition can be preferred in routine practice since they have low cost and are easy-to-apply. However, it should not be forgotten that the sensitivity and specificity of these tests are variable.

Keywords: Carbapenemase inactivation test, carbapenemases, *Klebsiella pneumoniae*

Alındığı tarih: 22.12.2016

Kabul tarihi: 07.02.2017

Yazışma adresi: Tayfun Demiray, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Adnan Menderes Cad., Sağlık Sok. 54100 Sakarya

e-posta: tayfurdemiray@gmail.com

GİRİŞ

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en güncel sağlık sorunlarından biridir⁽¹⁻³⁾. Karbapenem dirençli mikroorganizmalar ile gelişen enfeksiyonlarda, mortalite ve morbidite arttığı, hastanede yatış süresinin uzadığı ve tedavi maliyetlerinde artış olduğu görülmektedir. Bu enfeksiyonlar tedavide kullanılacak etkin antibiyotiklerin seçeneklerinin tükenmesi ve direncin hızlı yayılması nedeniyle de önemlidir⁽⁴⁻⁶⁾. Özellikle karbapenem dirençli *Klebsiella* türlerinin neden olduğu salgınlar ve sporadik olgular ülkemizde giderek artan sıklıkta rapor edilmeye başlanmıştır^(3,7,8). Genellikle karbapenemlere direnç karbapenemaz enziminin salınımı ile karbapenem moleküllerinin hidrolizi ile ortaya çıksa da porin kaybı ya da artmış eflüks pompa fonksiyonu gibi mekanizmalar da karbapenem direncine yol açabilmektedir⁽⁹⁾. Daha sık görülmesinin yanında, karbapenemaz enzimleri ile ortaya çıkan dirençte asıl önemli konu bu enzimleri kodlayan genlerin transfer edilebilen plazmidler üzerinde yer alması ve direncin bu plazmidler yardımı ile hızla aynı ve farklı türler arasında yayılabilmesidir⁽¹⁰⁾. Bu nedenle karbapenemaz üreten izolatların saptanması hem tedavinin doğru yönlendirilebilmesi hem de yayılımın önüne geçilebilmesi önem göstermektedir. Avrupa ülkelerinde 2014 ve 2015 yıllarını kapsayan ve ülkelerin karbapenemaz tiplerine göre epidemiyolojik durumunun gösterildiği bir raporda ülkemiz, özellikle OXA-48 tip karbapenemazlar açısından endemik, NDM-1 tip karbapenemazlar açısından bölgesel yayılımın gösterildiği, VIM açısından da hastanelerden salgınların bildirildiği bir ülke olarak tanımlanmıştır^(3,11). Bu durum ülkemiz gibi karbapenem direnci yönünden yüksek epidemiyolojik ülkelerde direncin saptanmasının önemini daha da artırmaktadır.

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izo-

latlarının saptanmasında fenotipik testlerden ve moleküler metodlardan sıklıkla yararlanılmaktadır. Moleküler testler hızlı ve güvenilir olmakla birlikte, yüksek maliyetli olmaları ve uygun teknik altyapı gerektirdiğinden, fenotipik testlerin rutin uygulamalarda kullanılması önerilmektedir⁽¹²⁾. Amerika merkezli Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) klavuzlarında antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında, karbapenem minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinde 2 µg/mL ve üzerindeki değerlerde modifiye *Hodge* testinin, Carba NP testinin ve/veya moleküler bir yöntem ile karbapenemaz üretiminin doğrulanmasını önermektedir⁽¹²⁾. Son dönemde hızlı sonuç veren, rutin laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilen, ticari kitlere göre maliyeti çok düşük olan karbapenemaz inaktivasyon testi adında fenotipik bir metot da kullanıma girmiştir⁽¹³⁾.

Bu çalışmada, moleküler metot ile karbapenemaz ürettiği doğrulanmış *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz inaktivasyon testinin tanısal değerinin modifiye *Hodge* testi ile kıyaslanması ve rutin laboratuvar pratiğinde kullanımının irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2014-2016 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden ve ertapenemli besiyeri kullanılarak tarama örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatları çalışma kapsamında değerlendirildi. Bu izolatların tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri VITEK® 2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile gerçekleştirildi. Karbapenem direncinden şüphelenilmesi durumunda gradient test stripleri (E-test, BioMérieux, Fransa) ile doğrulama yapıldı. Yorumlamalar CLSI 2015 klavuzuna göre yapıldı. İmipenem, meropenem ya da ertapenem minimal inhibitör konsantrasyonunun 2 µg/mL ve üzerinde saptanması duru-

munda karbapenem direnci varlığı kabul edildi. Bu çalışma kapsamında, 64 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatu irdelendi. *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu negatif kontrol, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 suşu ise pozitif kontrol olarak çalışmada kullanıldı.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarından karbapenemaz enzimi kodlayan gen varlığı moleküler yöntem ile gösterilen 59 adedi ve bir adet pozitif kontrol suşu, toplamda karbapenem dirençli 60 izolat ile karbapenem duyarlı, genişlemiş spektrum beta laktamaz negatif 59 adet *K. pneumoniae* izolatu ve bir adet negatif kontrol standart suşu, toplamda 60 karbapenem duyarlı *K. pneumoniae* izolatu genel toplam 120 olacak şekilde çalışmada kullanıldı. Karbapenem dirençli olup, karbapenemaz enzimi kodlayan gen varlığı gösterilemeyen beş adet *K. pneumoniae* değerlendirme dışı bırakıldı.

Modifiye Hodge Testi (MHT)

Mueller Hinton Agar (Merck, ABD) besiyerine *E. coli* ATCC 25922 standart suşu yayıldıktan sonra, meropenem 10 µg (BioMérieux, Fransa) diski plağın ortasına yerleştirildi. *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu negatif kontrol, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 suşu ise pozitif kontrol olarak çalışmada kullanıldı. Karbapenemaz üretiminin şüphelenilen izolatlar ile birlikte kontrol izolatları meropenem diskinin periferine doğru dik şekilde plağa ekildi. Diskin etrafındaki üreme saptanmayan zonda deformasyon saptanması durumunda test pozitif kabul edildi.

Karbapenemaz İnaktivasyon Testi (KİT)

Karbapenemaz inaktivasyon testi için çalışmaya karbapenemaz enzimi üretimi araştırılan izolatın bir öze dolusu alınarak steril distile su içinde süspansiyon hâline getirildi ve içine 10 µl meropenem diski (BioMérieux, Fransa) atıldı. İki saat inkübasyondan sonra *E. coli* ATCC 29522 ino-

küle edilmiş Mueller-Hinton (Merck, ABD) agar besiyerine süspansiyondan alınan meropenem diski yerleştirildi ve altı saat 35°C'de inkübe edildi. Altı saatlik sürenin sonunda Meropenem diskinin etrafında üreme olması (inhibisyon zonu oluşmaması) durumunda, testin sonucu pozitif kabul edildi⁽¹³⁾.

Moleküler Değerlendirme

Çalışmaya dâhil edilen tüm *Klebsiella* izolatlarında Gene-Xpert® sistemine ait Carba R kitleri (Cepheid, ABD) ile *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM} gen bölgeleri araştırıldı. Karbapenem dirençli izolatların kanlı besiyerinde 35-37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında, bu izolatlara ait taze kolonilerden steril eküvyon yardımı ile alınan koloniler Xpert örnek tampuna aktarıldı. Bu süspansiyondan iki ml, DNA ekstraksiyonunun, amplifikasyonun ve saptama reaksiyonlarının gerçekleştirileceği kullanıma hazır ticari kartuşa aktarıldı. Kartuş daha sonra Gene-Xpert® cihazına yüklenerek, üreticinin talimatlarına uygun şekilde sonuçlar bir saatlik sürede değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen 125 izolatın tümünde modifiye Hodge testi ve karbapenemaz inaktivasyon testi ile karbapenemaz varlığı araştırıldı. Çalışmada, bir adet standart suş haricinde toplam 64 adet karbapenem dirençli izolat moleküler yöntem ile de karbapenemaz kodlayan beş gen bölgesi araştırıldı. Bu incelemenin sonucunda, bu izolatlardan 27'sinde NDM-1, 20'sinde NDM-1/OXA-48, 11'inde OXA-48 ve birinde KPC gen bölgeleri saptandı. VIM ve IMP-1 gen bölgeleri hiçbir izolatta saptanmadı. Ayrıca beş izolatta, karbapenemaz araştırılan bu beş gen bölgesinden herhangi biri saptanmadı.

Modifiye Hodge testi ile 54 adet izolatta pozitif sonuç saptanırken, karbapenemaz inaktivasyon

Tablo 1. Karbapenemaz üreten *Klebsiella* izolatlarının belirlenmesinde fenotipik testler ve moleküler metodun kıyaslanması, (n=120).

Moleküler Yöntem	Modifiye Hodge Testi			Karbapenemaz İnaktivasyon Testi		
	Pozitif	Negatif	Toplam	Pozitif	Negatif	Toplam
Gene-Xpert®						
Pozitif	51	9	60	48	12	60
Negatif	3	57	60	4	56	60
Toplam	54	66	120	52	68	120

Tablo 2. Modifiye Hodge ve karbapenemaz inaktivasyon testlerinin tanısal performans değerleri.

	Modifiye Hodge Testi	Karbapenemaz İnaktivasyon Testi
Duyarlılık (%)	85	80
Özgüllük (%)	95	93
PPD (%)	94	92
NPD (%)	86	82
Test geçerliliği (%)	90	87

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

testinde 52 adet izolatta pozitiflik saptandı. Fenotipik test sonuçlarının moleküler yöntemle göre değerlendirilmesi Tablo 1’de yer almaktadır.

Moleküler yöntem altın standart olarak değerlendirildiğinde, modifiye Hodge testinin ve karbapenemaz inaktivasyon testlerinin duyarlılıkları sırasıyla 0.85 ve 0.80, özgüllükleri ise 0.95 ve 0.93 olarak hesaplanmıştır. Bu testlere ait test performans değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

TARTIŞMA

Çoklu dirençli Gram negatif bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılan karbapenemlere gelişen direnç tüm dünyada kaygı ile izlenmektedir⁽¹⁴⁾. Bu direncin doğru saptanması hem tedavinin uygun şekillendirilmesi hem de epidemiyolojik olarak enfeksiyon kontrol çalışmalarına veri sağlaması açısından önemlidir. Karbapenemazların doğru tespitinde öncelikle azalmış karbapenem duyarlılığı ve sonrasında fenotipik olarak enzim hidrolizine bağlı testlerin ya da biyokimyasal testlerin yapılması

önerilmektedir⁽¹⁵⁾. Bu amaçla modifiye Hodge testi rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan bir testtir. Son dönemde van der Zwaluw ve ark.⁽¹³⁾ tarafından fenotipik bir test olarak geliştirilen ve sekiz saatlik süre sonunda sonuç verebilen bir test olan karbapenemaz inaktivasyon testi kullanıma girmiştir.

Günümüzde Carba-NP®, Blue Carba®, kombine disklerle dayalı metodlar, gradient test stripleri gibi birçok ticari ürün karbapenemazların tesbitinde kullanılmaktadır^(3,16). Rutin laboratuvarlarda ticari ürünlerin kullanımı maliyet nedeniyle çok da yaygın değildir. Karbapenemaz inaktivasyon testinin en dikkat çekici özelliği mikrobiyoloji laboratuvarlarında modifiye Hodge testi gibi kolaylıkla yapılabilmesi ve modifiye Hodge testinden daha kısa sürede (sekiz saat) sonuçların elde edilebilmesidir. Yaptığımız bu çalışmada karbapenemaz inaktivasyon testinin performans değerleri modifiye Hodge testinin performans değerlerine yakın bulundu. Ancak *Klebsiella* izolatları ile yaptığımız bu çalışmada, karbapenemaz inaktivasyon testinin pozitif prediktif değeri 0.92 bulunurken, bu testin kullanımı ile ilgili ilk verileri sunan van der Zwaluw ve ark.⁽¹³⁾ bu testin moleküler metodla uyumunun *Enterobacteriaceae* izolatlarında %100, non-fermentatif bakterilerde ise %98.8 olduğunu belirtmektedir. Ayrıca aynı çalışmada, *Enterobacteriaceae* izolatlarında pozitif ve negatif prediktif değeri %100 olarak verilmektedir⁽¹³⁾. Yalnızca *Klebsiella* izolatları ile yaptığımız bu çalışmada ise, pozitif prediktif değer %92 ve negatif prediktif değeri %82 ola-

rak referans çalışmadan daha farklı sonuçlar elde ettik. Bu durum yeni kullanıma giren testler ile ilgili olabildiğince çok sayıda izolat kullanılarak yapılacak bilimsel çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

Karbapenemaz inaktivasyon testi enzim inaktivasyonuna dayalı bir test olarak rutin laboratuvarlarda kolaylıkla yapılabilmesi, modifiye Hodge testine göre daha kısa sürede sonuç vermesi testin avantajları olarak öne çıkmaktadır. Ancak, karbapenemaz inaktivasyon testini karbapenemaz üretiminin tespiti amacıyla kullanmayı planlayan laboratuvarların, testin farklı tanılal test performans değerleri olduğunu göz önünde bulundurmaları gerekmektedir. Moleküler yöntemler ile karbapenemaz genlerinin varlığını gösterebilecek altyapısı ve olanağı olmayan mikrobiyoloji laboratuvarlarında iki farklı fenotipik yöntemin kullanılması düşünülebilir.

Sonuç olarak, artan miktarda ve çeşitlilikte ortaya çıkan karbapenemazlara bağlı karbapenem direnci ile gelişen enfeksiyonların saptanmasında ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin geliştirilmesinde mikrobiyoloji laboratuvarlarının yaşamsal önemi vardır⁽¹⁶⁾. Kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli enzim inhibisyonuna bağlı fenotipik testler rutin uygulamalarda sıklıkla kullanılsa da bu testlerin duyarlılıkları ve özgüllüklerindeki değişkenliklerin olduğu unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:432-38. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x>
2. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:228-36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
3. Kılıç Ü, Demiray T, Altındış M. Karbapenemaz üreten enterobacteriaceae izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *ANKEM Derg* 2016; 30:62-75.
4. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27:128-42. <https://doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.128>
5. Canton R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:413-31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>
6. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Update* 2012; 15:237-47. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>
7. Kilic A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med* 2015; 35:382-83. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.3.382>
8. Karabay O, Altındış M, Koroglu M, Karatuna O, Aydemir OA, Erdem A. The carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; 15:6. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0118-4>
9. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:821-30. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>
10. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1503-7. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>
11. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann, H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries. *Euro Surveill* 2015; 20.
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, Clinical Laboratory Standards Institute, 2015.
13. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One* 2015; 10:e0123690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
14. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1791-8. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
15. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall, Dutch MA. Working Party on the detection of highly resistant microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrobial Agents* 2010; 36:205-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.05.014>
16. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods* 2014; 107:106-18. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.09.009>

Staphylococcus aureus Suşlarında Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direncinin Fenotipik Yöntemlerle Belirlenmesi ve Kinupristin/Dalfopristinin In Vitro Etkinliğinin Araştırılması[§]

Muharrem ÇİÇEK, Özlem TUNCER, Banu SANCAK, Burçin ŞENER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÖZ

Amaç: Staphylococcus aureus suşlarında artan metisilin ve makrolid direnci birçok ülkede önemli bir sorundur. Protein sentez inhibitörü olan kinupristin/dalfopristin (K/D), stafilokoklara ve diğer Gram pozitif bakterilere karşı etkili streptogramin grubu bir antibiyotiktir. Bu çalışmanın amacı, Mayıs 2015 - Nisan 2016 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi hastanelerinde klinik örneklerden izole edilmiş metisiline dirençli (MRSA) ve duyarlı S. aureus (MSSA) suşlarında makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS_B) direnç fenotiplerinin belirlenmesi ve bu izolatlar karşı kinupristin/dalfopristinin in vitro aktivitesinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Toplamda 151 S. aureus izolatı çalışmaya dâhil edilmiştir. İzolatlar konvansiyonel yöntemler ve VITEK MS (bioMérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. İzolatlardaki metisilin direnci sefoksitin (30 µg) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. MLS_B direnci eritromisin (15 µg) ve klindamisin (2 µg) disklerinin kullanıldığı D-test yöntemi ile araştırılmıştır. İzolatların metisilin, eritromisin, klindamisin ve K/D'e karşı in vitro duyarlılıkları EUCAST rehberine göre disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Değerlendirilen 151 S. aureus izolatının 44'ü MRSA, 107'si MSSA olarak belirlenmiştir. MLS_B direnci gösteren 48 S. aureus izolatının %50'sinin (24/48) induklebilir, %14.6'sının (7/48) yapısal ve %35.4'ünün (17/48) MS_B fenotipinde olduğu görülmüştür. Tüm S. aureus izolatları K/D'e karşı duyarlı bulunmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak, verilerimiz K/D'nin, MLS_B direnci olsa dahi hem MRSA hem de MSSA izolatlarına karşı in vitro koşullarda etkin olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Staphylococcus aureus, kinupristin/dalfopristin, streptogramin, MLS_B

ABSTRACT

Determination of Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Resistance in Staphylococcus aureus Strains by Phenotypical Methods and Investigation of In Vitro Activity of Quinupristin/Dalfopristin

Objective: The increasing resistance against methicillin and macrolide in Staphylococcus aureus strains is an important problem in many countries. Quinupristin/dalfopristin (Q/D) which is a ribosomal protein synthase inhibitor, is a member of streptogramin group of antibiotics effective against staphylococci and other gram positive bacteria. In this study, we aimed to investigate the MLSB phenotypes and in vitro activity of Q/D among methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-sensitive S. aureus (MSSA) strains isolated from clinical samples of patients between May 2015 and April 2016 in Hacettepe University hospitals.

Material and Methods: A total of 151 S. aureus strains were included in the study. The isolates were identified by using conventional methods and VITEK MS (bioMérieux, France). The resistance of the isolates to methicillin, has been determined with sefoxitin (30 µg) disc diffusion MLSB resistance was investigated by D-test method using erythromycin (15 µg) and clindamycin (2 µg) disks. Susceptibilities of isolates to methicillin, erythromycin, clindamycin and Q/D were determined by D-test method using erythromycin (15 µg) and clindamycin (2 µg) disks.

Results: Of the 151 S. aureus isolates, 44 were MRSA and 107 were MSSA. Of the 48 MLS_B resistant S. aureus isolates, 50% (24/48) revealed inducible type, 14.6% (7/48) constitutive type and 35.4% (17/48) MS_B type MLS resistance. All S. aureus strains were found to be susceptible to Q/D.

Conclusion: The results of the present study demonstrated that Q/D exhibited in-vitro inhibitory activity against both MRSA and MSSA isolates with or without MLS_B resistance

Keywords: Staphylococcus aureus, quinupristin/dalfopristin, streptogramin, MLS_B

Alındığı tarih: 30.09.2016

Kabul tarihi: 27.04.2017

Yazışma adresi: Banu Sancak, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

e-posta: banusancak@yahoo.com

Tel: (0312) 305 15 60

[§] Bu çalışmanın bir kısmı, III. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde (18-22 Kasım 2015, Antalya) poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Gerek toplum, gerekse hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında antibiyotik direncinin artması, tedavide kullanılabilecek antibiyotik seçeneklerini azaltmakta ve buna bağlı olarak morbidite ve mortalite oranlarında artışa neden olabilmektedir⁽¹⁻³⁾.

Makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS_B) grubu antibiyotikler içinde yer alan makrolid grubu antibiyotikler, beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençli stafilokoklarla enfekte ve penisilin alerjisi olan hastaların tedavisinde, günümüzde en sık kullanılan alternatif tedavi seçeneğidir. Ancak sık ve yaygın kullanımı sonucunda pek çok Gram pozitif etkende makrolid direnci giderek artmaktadır. MLS_B grubu antibiyotiklerden klindamisin bir linkozamid türevi olup, metisiline dirençli (MRSA) ve duyarlı (MSSA) *S. aureus* kaynaklı cilt, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan, ancak indüklenebilir klindamisin direncine bağlı olarak tedavi başarısızlıklarına yol açabilen bir ajandır⁽⁴⁾. Özellikle günümüzde beta-laktam grubu antibiyotiklerin tamamına dirençli kabul edilen ve kolaylıkla MLS_B grubu antibiyotiklere de direnç kazanabilen MRSA suşlarına bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaşanmaktadır⁽⁵⁾. Bu nedenle günümüzde kullanılan standart antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşlarının etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde farklı seçeneklere gereksinim duyulmaktadır.

Dirençli gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen kinupristin/dalfoprstin (K/D), Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 1999 yılında standart antibiyotiklere alternatif olarak kullanıma sunulmuş ajanlardan biridir⁽⁶⁾. ABD'de komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları (CYDİ) ve bakteriyemi endikasyonlarında, İngiltere'de ise

CYDİ ve nozokomiyal pnömoni endikasyonlarında ruhsatlı olan, ancak Türkiye'de klinik kullanıma henüz girmemiş olan K/D, streptogramin grubundan parenteral uygulanabilen ilk antibiyotiktir. K/D, %30 kinupristin (Streptogramin B), %70 dalfoprstin (Streptogramin A) içermektedir ve 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak hem peptid zincir uzamasını hem de peptidil transferaz enzimini inhibe ederek etki göstermektedir. K/D Gram pozitif bakterilere, özellikle de MRSA, viridans streptokok ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecium*'a karşı in vitro etkinliğe sahiptir^(3,6-9).

Çalışmamızda, klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA suşlarında MLS_B direnç fenotiplerinin belirlenmesi ve bu izolatlarda K/D in vitro aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Mayıs 2015-Nisan 2016 tarihleri arasında izole edilen ve çalışma kapsamında değerlendirilen 151 *S. aureus* izolatının izole edildikleri yerlere göre dağılımları Tablo 1'de sunulmuştur. Aynı hastadan alınan birden fazla örnekte üreyen izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır. *S. aureus* tanımlanması, konvansiyonel yöntemler (koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri) ve Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) sistemi kullanılarak yapılmıştır.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları EUCAST önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Tüm izolatların %5 koyun kanlı agardaki pasajlarından 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazır-

Tablo 1. *Staphylococcus aureus* izolatlarının örnek türü ve metisilin direncine göre dağılımı.

Klinik örnekler	MRSA n (%)	MSSA n (%)	Toplam n (%)
Pü	23 (52.3)	31 (29)	54 (35.8)
Solunum yolu	7 (15.9)	25 (23.3)	32 (21.2)
Kan	4 (9.1)	19 (17.8)	23 (15.2)
İdrar	3 (6.8)	13 (12.1)	16 (10.6)
Diğer	7 (15.9)	19 (17.8)	26 (17.2)
Toplam	44 (100)	107 (100)	151 (100)

landı ve Mueller-Hinton agar besiyerine yayılarak üzerine streptogramin duyarlılığı için K/D (15 µg, Becton Dickinson), metisilin duyarlılığı için sefoksitin (30 µg, Becton Dickinson), *MLS_B* direnç fenotipleri için ise eritromisin (15 µg, Becton Dickinson) ve klindamisin (2 µg, Becton Dickinson) diskleri yerleştirildi.

MLS_B direnç fenotipinin gösterildiği D-test yönteminde, bakteri süspansiyonlarının yayılıp, aralarında 20 mm mesafe olacak şekilde eritromisin ve klindamisin disklerinin yerleştirildiği Mueller-Hinton agar plakları 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Eritromisin ve klindamisine dirençli bulunan izolatlar yapısal *MLS_B* (*cMLS_B*), klindamisin inhibisyon zonunun eritromisin diskinin bakan tarafında küntleşme (D zonu) görülen izolatlar indüklebilir *MLS_B* fenotipi (*iMLS_B*); eritromisine dirençli, klindamisine duyarlı bulunan izolatlar ise MS fenotipi olarak kabul edildi^(10,11).

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen 151 *S. aureus* izolatının

107 (%70.9)'si MSSA, 44 (%29.1)'ü MRSA olarak tanımlanmıştır. MRSA'da eritromisin duyarlılığı %52.3 iken, MSSA'larda %74.8; MRSA'da klindamisin duyarlılığı %54.5 iken, MSSA'larda %89.7 oranında izlenmiştir. K/D'nin, metisilin ve *MLS_B* direncinden bağımsız olarak tüm izolatlara etkili olduğu gözlenmiştir (Tablo 2).

Staphylococcus aureus izolatlarında *MLS_B* direnç fenotiplerinin metisilin direnç profiline göre dağılımı Tablo 3'te verilmiştir. En az bir *MLS_B* direnç fenotipi gösteren izolat oranı MRSA ve MSSA'larda sırasıyla %47.7 ve %25.2 olarak saptanmıştır. *MLS_B* direnci gösteren 48 *S. aureus* izolatının %50'sinin (24/48) indüklebilir, %14.6'sının (7/48) yapısal ve %35.4'ünün (17/48) *MS_B* fenotipinde olduğu görülmüştür.

Tablo 3. *Staphylococcus aureus* izolatlarında *MLSB* direnç fenotiplerinin metisilin direnç profiline göre dağılımı.

	MRSA n (%)	MSSA n (%)	TOPLAM n (%)
<i>iMLS_B</i>	13 (29.5)	11 (10.2)	24 (15.9)
<i>cMLS_B</i>	7 (15.9)	0 (0)	7 (4.6)
<i>MS_B</i>	1 (2.3)	16 (15)	17 (11.3)
<i>MLS_B</i> yok	23 (52.3)	80 (74.8)	103 (68.2)
TOPLAM n (%)	44 (100)	107 (100)	151 (100)

iMLS_B: İndüklebilir; *cMLS_B*: Yapısal; *MS_B*: Eritromisin dirençli, klindamisin duyarlı

TARTIŞMA

Linkozamid grubu bir antibiyotik olan klindamisin özellikle MRSA kaynaklı cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde başvuru ilk seçenek ajanlardan biridir. Ancak *iMLS_B*

Tablo 2. *Staphylococcus aureus* izolatlarının eritromisin, klindamisin ve kinupristin/dalfopristine karşı in vitro duyarlılık sonuçları.

	K/D			Eritromisin			Klindamisin			D-zon
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
MRSA (%)	44 (100)	0 (0)	0 (0)	23 (52.3)	0 (0)	21 (47.7)	24 (54.5)	0 (0)	7 (15.9)	13 (29.6)
MSSA (%)	107 (100)	0 (0)	0 (0)	80 (74.8)	12 (11.2)	15 (14)	96 (89.7)	0 (0)	0 (0)	11 (10.3)
TOPLAM (%)	151 (100)	0 (0)	0 (0)	103 (68.2)	12 (8)	36 (23.8)	120 (79.5)	0 (0)	7 (4.6)	24 (15.9)

K/D: Kinupristin/dalfopristin, S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli

direnci nedeniyle klindamisin ile tedavide başarısızlıklar izlenebilmektedir^(11,12). Bu nedenle hem CLSI hem de EUCAST rehberlerinde enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen tüm stafilkok suşlarında iMLS_B direnç fenotipinin belirlenmesi için D-zon testinin yapılması önerilmektedir^(10,13). İn vitro duyarlılık testlerinde iMLS_B direnci araştırılmadığı takdirde, klindamisin için “yanlış duyarlı” yönünde sonuç verilebilmektedir. Adaleti ve ark.⁽¹⁴⁾ 100 MSSA suşu ile yapmış oldukları çalışmada, iMLS_B ve cMLS_B direnç fenotiplerini sırasıyla %11 ve %4 oranında, Ozansoy ve ark.⁽⁴⁾ 158 MRSA ve 246 MSSA suşu ile yaptıkları çalışmada, iMLS_B direnç oranını sırasıyla %56.3 ve %8.9, cMLS_B direncini ise %7.6 ve %2.9, Uzun ve ark.⁽¹¹⁾ 23 MRSA ve 69 MSSA suşunda, iMLS_B direnç oranını sırasıyla %22 ve %4, cMLS_B direncini ise %26 ve %19, Azap ve ark.⁽¹⁵⁾ 105 MRSA ve 111 MSSA suşu ile yaptıkları çalışmada, iMLS_B direnç oranını sırasıyla %5.7 ve %3.6, cMLS_B direncini ise %64 ve %4.6 olarak saptamışlardır. Delialioğlu ve ark.⁽¹⁶⁾ 128 MRSA suşunda konstitütif direnci %43.7, indüklenebilir direnci %5.4; 102 MSSA suşunda ise, iMLS_B direncini %10.7 oranında saptarken, konstitütif direnç belirlememişlerdir. Bu verilere dayanarak MLS_B direnç oranlarının merkezden merkeze belirgin farklılıklar gösterebileceği anlaşılmaktadır. Çalışmamızda, MSSA ve MRSA suşlarında iMLS_B direnç oranları sırası ile %10.2 ve %29.5 olarak saptanmıştır. MSSA suşlarında cMLS_B direnci saptanmamışken, MRSA suşlarının %15.9’unda cMLS_B direnci belirlenmiştir. MRSA suşlarının %29.5 oranında iMLS_B fenotipinde olması, klindamisin duyarlılığını raporlamada D zon testinin önemini vurgulamaktadır. EUCAST önerilerine göre iMLS_B fenotipinde klindamisin direnci saptanması hâlinde, izolat klindamisin dirençli olarak bildirilmeli, ancak sonuca klindamisin ciddi olmayan deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının kısa süreli tedavisinde kullanılabileceği yorumu da eklenmelidir⁽¹⁰⁾. Bu tür enfeksiyonların kısa

süreli klindamisin tedavisinde tam klindamisin direnci gelişme olasılığının çok düşük olduğu göz önünde tutularak, MRSA izolatları varlığında klindamisin iyi bir seçenek olduğu göz ardı edilmemelidir. Çalışmamızda, MSSA izolatlarındaki MLS_B direnç oranları Delialioğlu ve ark.’nın⁽¹⁶⁾ sonuçları ile uyum göstermektedir. Azap ve ark.⁽¹⁵⁾ ile Delialioğlu ve ark.’nın⁽¹⁶⁾ çalışmalarında, MRSA izolatlarında cMLS_B direnç fenotipi yüksek saptanmışken, bizim çalışmamızda iMLS_B direncinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmamızdaki MRSA izolat sayısının, bu çalışmalardaki izolat sayısından az olması bu oranlarda farklılığa neden olmuş olabilir. Ülkemizde yapılan bu çalışmalardaki farklı direnç oranlarının, bölgesel farklılıklardan, suşların izole edildiği örneklerin ve hastaların kullandıkları antibiyotiklerin farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir.

Günümüzde özellikle çoklu dirençli MRSA izolatlarının artışı ve buna bağlı olarak karşılaşılan tedavi güçlükleri yeni antibiyotik arayışlarını gündeme getirmiştir. Çalışmamızda da görüldüğü gibi, MLS_B direnci MRSA suşlarında önemli bir oranda izlenmektedir. Ayrıca Tablo 2’de görüldüğü gibi, MRSA’da MSSA’ya göre eritromisin ve klindamisin duyarlılığı düşük saptanmıştır. Bu durum da MRSA suşlarının etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde klindamisin kullanımını sınırlamaktadır. FDA tarafından 16 yaş üstü kişilerde komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında kullanımı için onay almış olan K/D, protein sentez inhibisyonu ile bakteriyostatik etki gösteren ve iki streptogramin antibiyotik kombinasyonu ile geliştirilen bir ajandır. Vankomisin yetersiz kaldığı MRSA enfeksiyonlarında da kullanılan ama hâlen ülkemizde klinik kullanımda bulunmayan K/D, MRSA bakteriyemisinde alternatif bir tedavi seçeneği olarak da önerilmektedir^(17,18). Ülkemizde *S. aureus* suşlarında K/D direnci ile ilgili yapılan çalışmalarda, Ekşi ve ark.⁽⁵⁾, 120 MRSA ve 123 MSSA suşunda, Doğruman Al ve

ark.⁽¹⁹⁾, 63 MRSA suşunda, Baysallar ve ark.⁽²⁰⁾, 38 MRSA suşunda, Yula ve ark.⁽²¹⁾, üç MRSA ve 21 MSSA suşunda K/D'e karşı herhangi bir direnç saptamamışken, Tünger ve ark.⁽²²⁾ E-test yöntemi ile değerlendirdikleri 127 MRSA suşundan üçünü (%2.4) K/D'e orta duyarlı olarak bildirmişlerdi. Aydeniz Ozansoy ve ark.⁽⁴⁾, 246 MSSA ve 158 MRSA suşunda bir MRSA ve bir MSSA suşunu, Yavuz ve ark.⁽²³⁾, 100 MSSA ve 100 MRSA suşundan yalnızca konjunktival sürüntüden izole edilmiş bir MRSA suşunu Q/D'e dirençli olarak saptamışlardır. Ulusoy ve ark.⁽²⁴⁾ 51 MSSA ve 43 MRSA suşundan disk difüzyon yöntemi ile K/D'e dirençli olarak belirledikleri üç MRSA suşunun E-test yöntemiyle orta duyarlı olduğunu saptamışlardır. Cesur ve ark.⁽²⁵⁾ ülkemizde yapmış olduğu çok merkezli çalışmada, E-test yöntemi ile değerlendirdikleri 260 MRSA suşundan %95'ini K/D'e duyarlı olarak saptamışlardır. EUCAST kriterlerine göre değerlendirildiğinde çalışmamıza dâhil edilen tüm *S. aureus* izolatlarının metisilin ve *MLS_B* direncinden bağımsız olarak K/D'e duyarlı olduğu gözlenmiştir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilen düşük direnç oranlarına rağmen, K/D'in stafilokoklara karşı yüksek in-vitro etkinlik gösterdiği belirlenmiş ve bu sonuçlar bu araştırmada da desteklenmiştir. Uluslararası literatür incelendiğinde, Kim ve ark.'⁽²⁶⁾ Kore'de yaptığı çalışmada, 243 MSSA ve 439 MRSA olmak üzere 682 *S. aureus* izolatının tamamı K/D'e duyarlı bulunurken, Luh ve ark.'⁽²⁷⁾ Taiwan'da MRSA suşları ile yaptığı çalışmada, K/D'e %31 oranında direnç bildirilmiştir. Tüm bu ulusal ve uluslararası çalışmaların sonuçlarından da anlaşılabileceği gibi ülkelere ve bölgelere göre K/D direnç oranı farklılık göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları da dikkate alındığında, ülkemizde K/D direnç oranlarının %0-5 arasında olduğu ve K/D'in *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde enfeksiyon bölgesi ve hastanın kliniğine göre seçilebilecek bir antibiyotik olduğunu vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, MRSA kaynaklı enfeksiyonlarda, *MLS_B* grubu antibiyotiklere karşı direncin belirlenmesi tedavi öncesi uygun ve etkili ilaç seçiminde yararlı olacaktır. Bunun yanı sıra ülkemizde henüz klinik kullanımda olmayan K/D, metisilin ve *MLS_B* direncinden bağımsız olarak *S. aureus* suşları ile gelişen enfeksiyonlarda özellikle direnç gelişiminin çok düşük düzeyde olması nedeniyle umut vadeden tedavi seçenekleri arasında sayılabilir.

KAYNAKLAR

1. Altıparlak Ü, Uslu H, Kireççi E, Aktaş F. Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2002; 16:69-72.
2. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339:520-32. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
3. Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:565-76.
4. Aydeniz Ozansoy F, Cevahir N, Kaleli I. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında makrolid, linkozamid ve streptogramin B direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:1-14. <https://doi.org/10.5578/mb.8790>
5. Ekşi F, Gayyurhan ED, Bayram A. Gaziantep üniversitesi hastanesinde izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2008; 22:203-8.
6. Arman D. Dirençli gram pozitif kok enfeksiyonları: kullanımdaki tedavi seçenekleri. *ANKEM Derg* 2008; 22(Ek 2):E287-96.
7. Bouanchaud DH. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39(Suppl A):A15-21. https://doi.org/10.1093/jac/39.suppl_1.15
8. Rehm SJ, Graham DR, Srinath L, Prokocimer P, Richard MP, Talbot GH. Successful administration of quinupristin/dalfopristin in the outpatient setting. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:639-45. <https://doi.org/10.1093/jac/47.5.639>
9. Speciale A, La Ferla K, Caccamo F, Nicoletti G. Antimicrobial activity of quinupristin/dalfopristin, a new injectable streptogramin with a wide Gram-positive spectrum. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 13:21-8. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00092-8)
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters 2015. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf (Erişim tarihi: Ocak 2017).
11. Uzun B, Güngör S, Pektaş B, et al. Klinik stafilokok izolatlarında makrolid-linkozamid-streptogramin B (*MLSB*) direnç fenotipleri ve telitromisin etkinliğinin

- araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:469-76.
https://doi.org/10.5578/mb.7748
12. **Levin TP, Suh B, Axelrod P, Truant AL, Fekete T.** Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1222-4.
https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1222-1224.2005
 13. **CLSI.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, Clinical Laboratory Standards Institute, 2015.
 14. **Adaleti R, Nakipoğlu Y, Taşdemir C, Kaya F, Ceran N, Taşdemir S.** Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarında makrolid-linkozamid-streptogramin B, ketolid ve linezolid direncinin araştırılması. *Flora* 2008; 13:189-93.
 15. **Azap Ö, Arslan H, Timurkaynak F, Yapar G, Oruc E, Gağır Ü.** Incidence of inducible clindamycin resistance in staphylococci: first results from Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:582-4.
https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01174.x
 16. **Delialioğlu N, Aslan G, Ozturk C, Baki V, Sen S, Emekdas G.** Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58:104-6.
 17. **Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, et al.** Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 2011; 52:e18-55.
https://doi.org/10.1093/cid/ciq146
 18. **Taşova Y.** Dirençli gram-pozitif bakteri infeksiyonlarında güncel tedavi. *Yoğun Bakım Dergisi* 2012; 10:147-64.
 19. **Doğruman Al F, Akça G, Aykan B, Sipahi A, Çağlar K.** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında kinupristin/dalfopristin, linezolid duyarlılıkları ve makrolit-linkozamid-streptogramin B direnci. *İnfeksiyon Derg* 2008; 22:153-63.
 20. **Baysallar M, Kilic A, Aydoğan H, Cilli F, Doganci L.** Linezolid and quinupristin/dalfopristin resistance in vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prior to clinical use in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23:510-2.
https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.09.029
 21. **Yula E, Ozer T, Deveci O, Tekin A, Yanik K, Durmaz S.** In vitro activity of quinupristin-dalfopristin, methicillin and vancomycin against *Staphylococcus* strains isolated from clinical samples. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2012; 21:45-9.
 22. **Tünger A, Aydemir S, Uluer S, Cilli F.** In vitro activity of linezolid & quinupristin/dalfopristin against Gram-positive cocci. *Indian J Med Res* 2004; 120:546.
 23. **Yavuz MT, Behçet M, Öztürk CE, Özaydın Ç, Kaya D.** *Staphylococcus aureus* suşlarının kinupristin/dalfopristin'e duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2006; 36:190-4.
 24. **Ulusoy MT, Köse Ş, Ece G, Tatar B.** Tepecik eğitim ve araştırma hastanesinde klinik örneklerden izole edilen gram pozitif kokların kinopristin/dalfopristin duyarlılığının incelenmesi ve diğer antibiyotiklerle karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; 32:1260-6.
 25. **Cesur S, Irmak H, Şimşek H ve ark.** Türkiye'de yedi ildeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen MRSA suşlarında VISA-VRSA araştırılması ve antibiyotik duyarlılık durumlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46:352-8.
 26. **Kim HB, Jang HC, Nam HJ, et al.** In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1124-7.
https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1124-1127.2004
 27. **Luh KT, Hsueh PR, Teng LJ, et al.** Quinupristin-dalfopristin resistance among gram-positive bacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3374-80.
https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3374-3380.2000

Kan Kültüründe Koagülaz Negatif Stafilokok Üreyen ve CDC Kriterlerine Göre Etken/Kontaminant Ayrımı Yapılan Hastaların Demografik ve Bazı Klinik Özelliklerinin Karşılaştırılması[§]

Yasemin Derya GÜLSEREN*, Ayşe Esra KARAKOÇ*, Gamze TÜRKÖĞLU*, Cemal BULUT**

*Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

**Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

ÖZ

Amaç: Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) sağlık hizmeti kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonlarına neden olurlar ve aynı zamanda deri florasının elemanıdır. Çalışmamızda KNS üremesi belirlenen kan kültürlerinde etken/kontaminant ayrımı için hastaların çeşitli klinik ve laboratuvar parametrelerinin kullanımının değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Kan kültürlerinden izole edilen KNS kökenlerinin etken ya da kontaminant olarak sınıflanması hastanemiz enfeksiyon kontrol ekibinin CDC kriterlerini esas alarak yaptığı değerlendirmeye göre yapıldı. Çalışmada, KNS'ye bağlı kan dolaşımı enfeksiyonu olduğu düşünülen 25 hasta etken grubunu oluşturdu. Benzer demografik özelliklere sahip olan ve KNS üremesinin kontaminasyon olarak değerlendirildiği 50 hasta kontrol grubu olarak belirlendi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde, Pearson'un ki-kare testi veya Fisher'in kesin ki-kare testi, gruplar arası ortalama karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik için $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi ve istatistiksel analizlerin tümünde SPSS 21.0 paket programı kullanıldı.

Bulgular: İki grup arasında çeşitli laboratuvar ve klinik parametreler karşılaştırıldı. Santral venöz kateter varlığı ($p=0.02$) ve enfeksiyon öncesi hastanede yatış süresi ($p=0.001$) yönünden gruplar arasında anlamlı düzeyde fark bulundu. Bir veya daha fazla SIRS kriterinin varlığı (ateş $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$, kalp hızı $>90/\text{dakika}$, lökosit sayısı >12000 veya $<4000/\text{mm}^3$, immatür nötrofil oranı $>10\%$) karşılaştırıldı. İki grup arasında bir veya daha fazla SIRS kriterine sahip olma bakımından da anlamlı farklılık yoktu ($p=0.3$).

Sonuç: Kan kültür setinde üreyen KNS'lerin etken/kontaminant ayrımını yapmak oldukça zor bir karardır. İkinci bir kan kültürü seti gönderilmediyse bu kararı vermek daha da zorlaşır. Laboratuvar hastaya ait çeşitli klinik ve laboratuvar parametrelerini göz önünde bulundurularak bir sonuca ulaşmaya çalışır. Çalışmamızda, ateş, kalp hızı, beyaz küre sayısı, sistolik ve diastolik kan basıncı, cerrahi girişim, diyaliz kateteri varlığı ve metisilin direnci doğru sonuca ulaşmada yardımcı olmamıştır. Kan kültürlerinde üreyen KNS kökenlerinde etken/kontaminant ayrımı günlük pratikte hem rutin mikrobiyoloji laboratuvarları, hem de klinisyenler için önemli bir sorun olmaya devam edecek gibi görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Gerçek bakteriyemi, kan dolaşımı enfeksiyonu, koagülaz negatif stafilokok, kontaminasyon

ABSTRACT

Comparison of Demographic and Some Clinical Features of Patients Whose Blood Cultures Revealed Growth of Coagulase Negative Staphylococci and Differentiation Between Infectious Agent and Contaminant was Performed According to the CDC Criteria

Objective: Coagulase negative staphylococci (CoNS) cause health care associated circulatory system infections. They are also the inhabitants of normal skin flora. In this study we aimed to evaluate use of various clinical and laboratory parameters of the patients whose blood cultures revealed growth of CoNS so as to differentiate between infectious agent and contaminant in the blood cultures of these patients.

Material and Methods: The classification of CoNS isolated from the blood cultures as a real pathogen or a contaminant was based on the evaluation of the infection control team that used the CDC criteria. According to this evaluation the study group with CoNS as the infecting agent consisted of 25 patients and the control group with CoNS as the contaminant consisted of 50 patients. The clinical and laboratory parameters were compared using the software of SPSS 21.0. Mann-Whitney U test was used to compare means of the study parameters. Pearson's chi-square test and Fisher's exact chi-square test were used to compare the categorical variables.

Results: Two groups were compared in terms of clinical and laboratory parameters. The presence of central venous catheter ($p=0.02$) and duration of stay in hospital prior to infection ($p=0.001$) was significantly different between groups. Presence of one or more SIRS criteria (temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$, heart rate $>90/\text{bpm}$, leucocyte count >12000 or $<4000/\text{mm}^3$, percentage of immature neutrophils $>10\%$) was also compared. There was no difference between two groups in terms of presence of one or more SIRS criteria.

Conclusion: It is hard to differentiate between a pathogen/contaminant CoNS isolated from blood culture set of a patient. The decision becomes even harder if a second blood culture set has not been sent. The laboratory tries to come to a conclusion by considering clinical and laboratory parameters concerning the patient. In our study fever, heart rate, white blood cell count, systolic and diastolic blood pressures, presence of a dialysis catheter, surgery and resistance to methicillin per se did not help to arrive at a correct conclusion. Differentiation between pathogen and contaminant CoNS grown in blood cultures seems to continue to be one of the most problematic issues in daily practice with respect to both routine microbiology laboratories and clinicians.

Keywords: True bacteremia, blood stream infection, coagulase-negative staphylococcus, infecting pathogen, contamination

Alındığı tarih: 12.08.2016

Kabul tarihi: 02.05.2017

Yazma adresi: Yasemin Derya Gülsüren, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

e-posta: yaseminderyak@yahoo.com

[§] Bu çalışma, 26. ECCMID Kongresi'nde (09-12 Nisan 2016, Amsterdam, Hollanda) P-1028 no'lu poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) deri ve mukozanın normal flora elemanları oldukları için uzun yıllar kontaminant bakteriler olarak değerlendirilmişlerdir. Yatan hastalarda santral venöz kateter kullanımının artmasıyla birlikte dolaşım sistemi enfeksiyonlarının önemi de artmıştır. Özellikle klinisyenler için günlük pratikte bu bakterilerin klinik önemini değerlendirmek giderek zorlaşmaktadır⁽¹⁾. Gereksiz antibiyotik kullanımının engellenmesi, hastanede yatış süresinin kısaltılması ve mali kayıpların önlenmesi için gerçek bakteriyemi/kontaminasyon ayrımının doğru şekilde yapılması önemlidir⁽²⁾.

KNS'nin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonu tanısı konurken, genellikle CDC (Centers for Disease Control and Prevention) kriterlerinden yararlanılır. Bunlar, enfeksiyon bulgularıyla (ateş, hipotansiyon) birlikte 48 saat içinde ikiden fazla kan kültüründe üreme olması ve başka bir enfeksiyon odağının bulunmamasıdır⁽³⁾. Laboratuvarların yoğun iş akışı içinde hastayla ilgili yeterli klinik bilgi alınamadığında ve tek kan kültürü gönderilmesi durumunda etken/kontaminant ayrımında ciddi zorluklar yaşanmaktadır. Çalışmamızda, KNS üremesi belirlenen kan kültürlerinde etken/kontaminant ayrımı için, hastaların çeşitli klinik ve laboratuvar parametrelerinin kullanımının değerlendirilmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ocak 2012-Aralık 2013 tarihleri arasında Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin farklı yoğun bakım ve servislerinden Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan kültürlerine ait sonuçlar geriye dönük olarak değerlendirildi. KNS üremesi belirlenen 75 hasta çalışmaya dâhil edildi. İzole edilen KNS kökenlerinin etken ya da kontaminant olarak sınıflanması hastanemiz enfeksiyon kontrol ekibinin CDC kriterlerini esas

olarak yaptığı değerlendirmeye göre yapıldı. Hastanın klinik bulgularına ve CDC kriterlerine göre KNS'ye bağlı kan dolaşım enfeksiyonu olduğu düşünülen 25 hasta etken grubunu oluşturdu. Benzer demografik özelliklere sahip olan ve KNS üremesinin kontaminasyon olarak değerlendirildiği 50 hasta kontrol grubu olarak belirlendi. Her iki grup demografik özellikleri, bazı klinik özellikleri ve laboratuvar parametreleri yönünden karşılaştırıldı. Otomatize kan kültür sistemi olarak BacT/Alert (bioMérieux, Fransa) kullanıldı. Şişeler sisteme yüklendikten sonra pozitif alarm veren şişelerden preparat hazırlanarak Gram yöntemi ile boyandı; aynı zamanda %5 koyun kanlı agar ve EMB agara pasaj yapılarak 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen bakterilerin tanımlanmasında katalaz testi, tüp koagülaz ve ViTEK (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanıldı. Metisilin direnci otomatize sistemin yanı sıra CLSI önerileri doğrultusunda sefoksitin diski kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle de tanımlandı.

Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde Pearson'un ki-kare testi veya Fisher'in kesin ki-kare testi, gruplar arası ortalama karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik için $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi ve istatistiksel analizlerin tümünde SPSS 21.0 paket programı kullanıldı.

BULGULAR

İki grup arasında yaş ortalaması ve cinsiyet yönünden anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Ateş, kalp atım hızı, beyaz küre, sistolik kan basıncı, diastolik kan basıncı, diyaliz kateteri varlığı, cerrahi girişim, metisilin direnci, hastanın taburcu veya ex olması durumu açısından farkın istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). Santral venöz kateter (SVK) varlığı ($p = 0.02$) ve enfeksiyon öncesi hastanede ortalama yatış süresi ($p = 0.001$) gruplar arasında anlamlı düzeyde farklı bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. Kan kültüründe koagülaz negatif stafilokok üremesi olan ve CDC kriterlerine göre etken ve kontaminant olarak değerlendirilen hastaları karşılaştırılan özellikler.

Parametreler	Etken (n=25)	Kontaminant (n=50)	p değeri
Yaş ortalaması	65.08±20.3	66.2±14.6	0.7
Cinsiyet	14 Kadın 11 Erkek	27 Kadın 23 Erkek	0.8
Ateş >38°C veya <36°C	14	24	0.5
Kalp hızı >90/dakika	16	41	0.08
Beyaz küre sayısı >12000 veya <4000	14	29	0.8
Sistolik kan basıncı (mmHg)	114.7±23.8	124.1±24.6	0.06
Diastolik kan basıncı (mmHg)	61.5±12.6	67.4±12.04	0.1
Santral venöz kateter varlığı	23	18	0.02
Diyaliz kateteri varlığı	7	10	0.4
Cerrahi girişim	4	8	0.6
Metisilin Direnci	24	41	0.09
Eksitüs Taburcu	16 8	27 23	0.5
Enfeksiyon öncesi hastanede ortalama yatış süresi	47±64.4	12.08±10.7	0.001

Bir veya daha fazla SIRS (severe inflammatory response syndrome) kriterinin varlığı (ateş >38°C veya <36°C, kalp hızı >90/dakika, lökosit sayısı >12000 veya <4000/mm³, immatür nötrofil oranı >%10) karşılaştırıldı. Solunum hızı tüm hasta dosyalarında kaydedilmediği için yapılan analizde bu parametre dışlandı. Herhangi bir SIRS kriterini karşılamayan ancak SVK olan hastalar ayrıca gruplandırıldı. İki grup arasında bir veya daha fazla SIRS kriterine sahip olma bakımından da anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.3) (Tablo 2).

TARTIŞMA

Son 15 yılda santral venöz kateter ve diğer prospektif cihazların kullanımının artmasıyla birlikte, KNS kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonlarında önemli artış meydana gelmiştir^(3,4). Ancak KNS'ler normal deri florasında bulunmaları

Tablo 2. Hastalarda bir veya daha fazla SIRS kriteri varlığının koagülaz negatif stafilokokun etken ve kontaminant olduğu gruplarda karşılaştırılması.

Bir veya daha fazla SIRS	Etken (n=25)	Kontaminant (n=50)
1 SIRS kriteri	8	15
2 SIRS kriteri	6	21
3 SIRS kriteri	8	12
SVK	3	3

(p=0.3)

nedeniyle özellikle yetersiz deri antisepsisi yapıldığında kontaminasyona yol açma olasılığı oldukça yüksek olan bakterilerdir^(5,6). Yapılan çalışmalara rağmen, kan kültürlerinde izole edilen KNS'lerin etken/kontaminant ayrımında altın standart bir yöntem ya da yaklaşım ortaya konulamamıştır⁽⁷⁾.

Çalışmamızda, hastaların çeşitli klinik ve labo-

ratuvar parametrelerinin, kan kültürlerinde KNS üremeleri olduğunda, bunların gerçek bakteriyemi etkeni/kontaminasyon yönünden ayırımında ne düzeyde belirleyici olduklarını değerlendirdik. Araştırılan parametreler, ateş, beyaz küre sayısı, kalp hızı, kan basıncı, diyaliz ve santral kateter varlığı, taburculuk durumu ve enfeksiyon öncesi hastanede yatış süresiydi. Çalışmamızda, kan kültürlerinde izole edilen KNS kökenlerinin etken olup olmadıklarına CDC kriterleri dikkate alınarak, 48 saat içinde farklı zamanlarda ve/veya farklı venöz girişimle alınan en az iki set kan kültüründe üreme olup olmamasına göre karar verildi Bunun dışında KNS'lerin gerçek bakteriyemi etkeni olarak kabul edilmesinde, hastanın en az üç SIRS kriterini taşıması ve başka bir enfeksiyon odağının bulunmaması göz önünde bulunduruldu.

Garcia-Vazquez ve ark.⁽¹⁾ yaptıkları çalışmada, klinik olarak anlamlı olan KNS üremelerinde iki ve üzerinde kan kültür setinde üreme olma oranını %64, klinik olarak anlamlı olmayan grupta bu oranı %25 olarak saptamıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Finkelstein ve ark.'nın⁽⁸⁾ çalışmalarında da, benzer şekilde ikiden fazla kültürde üreme gerçek bakteriyemi belirlenmesinde anlamlı bulunmuştur. Çalışmamızda, gerçek bakteriyemi tanısı koyarken öncelikli kriter olarak en az iki set kan kültürünün pozitif olması dikkate alındı. Ancak, laboratuvarımıza gönderilen kan kültürü örneklerinin çoğunluğunu anestezi yoğun bakım, nöroloji yoğun bakım, cerrahi yoğun bakım ve dâhiliye yoğun bakım gibi sağlık çalışanlarının iş yoğunluğunun oldukça yüksek olduğu birimler oluşturmaktaydı. Çalışmamızda, her hasta için yeterli sayıda kan kültürü gönderilmesi olası olmadı. Yeterli sayıda kan kültürü gönderilmeyen hastalarda, hastanın doktorunun ya da enfeksiyon kontrol ekibi doktorunun hastada sepsis bulgularının varlığını düşünmesi ve başka enfeksiyon odağının bulunmaması etkenin gerçek bakteriyemi etkeni olarak değerlendirilmesini sağladı. Çalışmamıza benzer şekilde daha önce yapılan farklı çalışmalarda, tek set kan kültüründe

KNS üremesinin her zaman kontaminant olarak değerlendirilmemesi gerektiği bildirilmiş^(9,10) ve bu nedenle CDC kriterlerinin klinik tanıdaki yerinin sorgulanması önerilmiştir.

Wohoush ve ark.⁽³⁾ çalışmalarında, moleküler genotiplemeyi referans alarak, CDC kriterleri ve tür identifikasyonunun duyarlılık ve özgüllüklerini karşılaştırmışlardır. CDC kriterlerinin duyarlılığı %91, ancak özgüllüğü %21 bulunmuş ve suş identifikasyonunda ise duyarlılık %100, özgüllük %48 olarak bildirilmiştir. CDC kriterlerinin tarama için daha uygun olduğu düşünülmüş, tür identifikasyonunun ise basit ve hızlı bir teknik olduğu, ancak son tanı için tek başına yeterli olamayacağı öne sürülmüştür. Bakteriyemiye yol açan KNS izolatlarının çoğunluğunun *Staphylococcus epidermidis* olduğu daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir^(1,11). Çalışmamızın kısıtlamalarından biri, KNS'lerin tür düzeyinde identifikasyonunun biyokimyasal ve konvansiyonel testlerle yapılmamış olmasıdır. Tek başına otomatize sistemle yapılmış olan KNS tür identifikasyonunun, doğrulanması yapılamadığından çalışma parametrelerimiz arasında değerlendirilmesi uygun görülmemiştir.

Elzi ve ark.⁽²⁾ KNS'lerin gerçek bakteriyemi etkeni ile kontaminant olduğu grupları karşılaştırdıkları çalışmalarında, ateş, beyaz küre sayısı, kalp hızı, kan basıncı ve santral venöz kateter varlığını gerçek bakteriyemide anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda, bu parametrelerden yalnızca santral venöz kateter varlığı ($p=0.02$) KNS'lerin gerçek bakteriyemi etkeni olduğu grupta anlamlı olarak yüksek bulundu. Tacconelli ve ark.⁽⁹⁾ çalışmalarında, santral venöz kateter varlığını hem metisiline dirençli KNS bakteriyemisi, hem de metisiline duyarlı KNS bakteriyemisi için risk faktörü olarak ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızdaki enfeksiyon etkeni olan KNS suşlarının 24'ünde (%96) metisilin direnci bulunurken, kontaminant olan KNS suşlarının 41'inde (%82) metisilin direnci mevcuttu. İki

grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Klingenberg ve ark.'nın⁽¹²⁾ yenidoğanlarda yaptıkları çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen etken ve kontaminant KNS suşlarının metisilin direnci karşılaştırılmıştır. Enfeksiyon etkeni olan suşların %81'inde, kontaminant suşların ise %65'inde metisilin direnci belirlenmiş, çalışmamızın aksine sonuç istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.019$) bulunmuştur.

Çalışmamızda, bir ve/veya birden fazla SIRS kriterini karşılama yönünden ve herhangi bir SIRS kriterini karşılamayan hastalarda ise santral venöz kateter varlığı yönünden etken/kontaminant grup karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı fark belirlenmedi ($p = 0.3$). Elzi ve ark.⁽²⁾ çalışmalarında hasta grubunun %50'sinin üç ve üzerinde SIRS kriterini karşıladığını, ancak bunların yalnızca %36'sının KNS bakteriyemisi olduğunu belirlemişler, yalnızca SIRS kriterlerine dayanarak bakteriyemi kararı vermenin gereksiz antibiyotik kullanımına yol açabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda, hasta ve kontrol gruplarında SIRS kriterlerinin değerlendirilmesinde bazı güçlüklerle karşılaşıldı. Kan kültürü alınmadan önce hastanın antipiretikle tedavi edilmesi, takipnenin ise kayıtlarda yer almaması çalışmamızın sınırlamaları olarak kabul edildi.

Bulgularımız, hastada santral venöz kateter varlığının, kan kültürlerindeki KNS üremelerinde gerçek bakteriyemi/kontaminasyon ayrımı için önemli bir parametre olabileceğini göstermektedir. SIRS kriterlerini değerlendirmede hasta yönetimi kaynaklı bazı kısıtlamalarla karşılaşılması olasıdır. Çalışmamızda bu kriterler KNS bakteriyemi/kontaminasyon ayrımı için katkı sağlayıcı faktörler olarak belirlenmemiştir. Kan kültürlerinde etken ve kontaminant olan KNS kökenleri arasında metisilin direnci açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Doğru antimikrobiyal tedaviye ulaşılmasında kan kültürlerindeki KNS üremeleri için gerçek bakteriyemi kararını vermek oldukça önemlidir; ancak hâlen klinisyenler ve laboratuvar çalışanlarına önerilebilecek net bir yaklaşım bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. **García-Vázquez E, Fernández-Rufete A, Hernández-Torres A, Canteras M, Ruiz J, Gómez J.** When is coagulase-negative *Staphylococcus* bacteraemia clinically significant? *Scand J Infect Dis* 2013; 45:664-71. <https://doi.org/10.3109/00365548.2013.797599>
2. **Elzi L, Babouee B, Vögeli N, et al.** How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:E355-61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03964.x>
3. **Al Wohoush I, Rivera J, Cairo J, Hachem R, Raad I.** Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:569-71. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03372.x>
4. **Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP.** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999; 29:239-44. <https://doi.org/10.1086/520192>
5. **Çiçek A, Kuzucu Ç, Durmaz B.** Kan kültür sonuçlarının değerlendirilmesinde etkili olan faktörler. *İnönü Ünv Tıp Fak Derg* 2005; 12:277-80.
6. **Antony SJ, Diaz-Vasquez E, Stratton C.** Clinical experience with linezolid in the treatment of resistant gram-positive infections. *J Natl Med Assoc* 2001; 93:386-91.
7. **Weinstein MP.** Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Immunol* 2003; 41:2275-8. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2275-2278.2003>
8. **Finkelstein R, Fusman R, Oren I, Kassir I, Hashman N.** Clinical and epidemiologic significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in tertiary care university Israeli hospital. *Am J Infect Control* 2002; 30:21-5. <https://doi.org/10.1067/mic.2002.118406>
9. **Tacconelli E, D'Agata EM, Karchmer AW.** Epidemiological comparison of true methicillin-resistant and methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococcal bacteremia at hospital admission. *Clin Infect Dis* 2003; 37:644-9. <https://doi.org/10.1086/377207>
10. **Mirret S, Weinstein MP, Reimer LG, Wilson ML, Reller LB.** Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3279-81. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3279-3281.2001>
11. **Refsahl K, Andersen BM.** Clinically significant coagulase-negative staphylococci: identification and resistance patterns. *J Hosp Infect* 1992; 22:19-31. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(92\)90127-8](https://doi.org/10.1016/0195-6701(92)90127-8)
12. **Klingenberg C, Aarag E, Rønnestad A, et al.** Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates : association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24:817-22. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000176735.20008.cd>

Gemella haemolysans'ın Etken Olduğu Bir Ampiyem Olgusu

Esra KAYA*, Muhammet SAYAN**, Mahmut TOKUR**, Murat ARAL*

*Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

**Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

ÖZ

On dokuz yaşında Ewing sarkom tanısıyla takip edilen hastada, nefes darlığı nedeni ile çekilen toraks bilgisayarlı tomografisinde, sağ akciğerde loküle sıvı saptanması nedeni ile hastaya torasentez yapılmıştır. Torasentez sonucunda ampiyem olduğu belirlenmiştir. Belirli zaman aralıkları ile yapılan üç ardışık plevral sıvı kültüründe etken olarak *Gemella haemolysans* saptanmıştır. Yapılan antibiyogramında amoksisilin/klavulonik asit, ampisilin/sulbaktam, tetrasiklin, seftazidim, siprofloksasin ve levofloksasine dirençli imipenem duyarlı bulunmuştur. Antibiyogram sonucuna göre imipenem tedavisi alan hasta klinik ve radyolojik bulguların gerilemesi üzerine taburcu edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ampiyem, ardışık kültür, *Gemella haemolysans*, torasentez

ABSTRACT

An Empyema Case That is Caused by *Gemella haemolysans*

A 19 year- old patient monitored with the diagnosis of Ewing sarcoma underwent thoracentesis to relieve locular effusion detected in the right lung visualized on thorax computed tomography obtained because of the dyspneic complaint of the patient. Thoracentesis revealed the presence of empyema. *Gemella haemolysans* was isolated in three consecutive pleural fluid culture implemented at determined intervals. According to antibiotic susceptibility tests this agent was found to be susceptible to imipenem, and resistant to amoxicilline/clavulanic acid, ampiciline/sulbactam, tetracycline, ceftazidime, ciprofloxacin and levofloxacin. The patient receiving imipenem treatment according to antibiogram results was discharged upon regression of his/her? clinical and radiological findings.

Keywords: Empyema, consecutive culture, *Gemella haemolysans*, thoracentesis

GİRİŞ

Gemella haemolysans ilk olarak 1938'de *Neisseria haemolysans* olarak tanımlanmıştır⁽¹⁾. *Neisseria haemolysans*'ın tipik bir *Neisseria* türü olmamasından dolayı 1960 yılında yeni bir cins olarak *Gemella* cinsi oluşturulmuştur⁽²⁾. Hücre duvarı yapısı ve diğer bazı biyokimyasal testler sonucunda *Gemella* cinsi, *Neisseriaceae* ailesinden ayrılıp, *Streptococcaceae* ailesine dâhil edilmiştir⁽³⁻⁵⁾. *G. haemolysans* Gram pozitif, sporsuz, fakültatif anaerop, hareketsiz bir koktur. Katalaz, oksidaz ve üreaz testleri olumsuzdur. Muköz membranlarda, üst gastrointestinal sistemde normal flora elemanı olarak bulunabilir⁽⁶⁾. *G. haemolysans*'ın etken olarak

bildirildiği hastalıklar arasında endokardit, menenjit, beyin apsesi, spondilodiskit, endoftalmit, ampiyem bulunmaktadır⁽⁷⁻¹⁴⁾. Bu raporda, ardışık plevral sıvı kültürlerinde *G. haemolysans* üretilen ampiyemi olan bir hasta sunulmuştur.

OLGU

Evre 4 Ewing sarkomu tanısını 2009 yılında alan, 19 yaşında erkek hastada, Ocak 2015'te yapılan akciğer biyopsisi ile akciğer metastazı varlığı saptanmıştır. Hastaya kemoterapi uygulanmıştır. Haziran 2016'da hastada ortaya çıkan nefes darlığı, ateş, hâlsizlik yakınması üzerine çekilen toraks bilgisayarlı tomografisinde sağ akciğerde loküle sıvı saptanmıştır. Bunun üzeri-

Alındığı tarih: 23.02.2017

Kabul tarihi: 31.05.2017

Yazışma adresi: Esra Kaya, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş

Tel: +90 344 300 29 10

e-posta: esra_ytn@hotmail.com

ne göğüs cerrahisi servisine yatırılan hastaya yapılan torasentezde ampiyem saptanmıştır. Hastaya tüp torakostomi uygulanmıştır. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına plevral sıvı numunesi gönderildikten sonra hastaya ampirik olarak piperasilin/tazobaktam tedavisi başlanmıştır.

Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ardışık üç plevral sıvı numunesinin Gram boyaması, koyun kanlı agara, çikolatamsı agara ve EMB (eozin metilen blue) besiyerine ekimleri yapılmıştır. Ekimlerin yapıldığı koyun kanlı agar ve çikolatamsı agar besiyerleri 48 saat karbondioksitli ortamda tutulmuştur. Alfa-hemoliz oluşturan, büyük, mat koloniler Gram boyamada Gram pozitif tetratlar ve kısa zincirler oluşturan koklar olarak görülmüştür.

Ardışık üç ekimde de üreyen oksidaz ve katalaz testleri olumsuz bulunan bu koloniler Phoenix™ - 100 (Becton Dickinson, Diagnostic Instrument System, Sparks, ABD) otomatize sistemle *Gemella haemolysans* olarak tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile %5 koyun kanı içeren Müller-Hinton agarın %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu ile yapılmıştır. İzolatların antibiyotiklere duyarlılığı viridans grubu streptokoklar için kullanılan CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre belirlenmiştir⁽¹⁵⁾. Yapılan antibiyogramında amoksisilin/klavulonik aside, ampisilin/sulbaktam, tetrasikline, seftazidime, siprofloksasine ve levofloksasine dirençli, imipeneme duyarlı olarak bulunmuştur. Hastaya ampirik olarak sekiz gün piperasilin/tazobaktam tedavisi uygulanmasına rağmen, hastada klinik bir düzelme olmamakla birlikte, prokalsitonin ve CRP değerlerinde yükselme olmuştur. Tüm bunlarla birlikte antibiyogram sonucuna da bağlı olarak tedavisi imipenem olarak değiştirilmiştir. İmipenem tedavisi sekiz gün uygulandıktan sonra hastanın klinik ve radyolojik bulgularının gerilemesi ve prokalsitonin ile CRP değerlerinin

normale dönmesi üzerine hasta taburcu edilmiştir.

TARTIŞMA

Gemella haemolysans Gram pozitif, fakültatif anaerop bir koktur. Gram pozitif olmasına rağmen, kolay dekolore olup, Gram negatif görünebilir^(8,9). Üst gastrointestinal sistemde ve üst solunum yollarında normal flora elemanı olarak bulunabilir⁽¹⁾. Virülansı düşük bir mikroorganizma olmasına rağmen, predispozan faktörler varlığında ciddi lokalize ya da sistemik enfeksiyonlara neden olabilir⁽¹⁶⁾. Endokardit, spondilodiskit, menenjit, endoflamit, plevral ampiyem gibi hastalıklar için ender etkenlerdendir⁽⁷⁻¹⁴⁾.

Gemella haemolysans'ın en sık neden olduğu sistemik enfeksiyon endokardittir⁽⁹⁾. Genellikle altta yatan malignite, immünsupresyon, kalp hastalıkları, kötü ağız hijyeni, cerrahi müdahale gibi durumlar sonrasında enfeksiyon etkeni olarak saptanmıştır^(7,8,10). Olgumuzda da Ewing sarkom sonucundaki akciğer metastazı ve kemo-terapi tedavisi sonrasında gelişen plevral ampiyemde etken olarak saptanmıştır. Literatürde daha önceden bildirilmiş olan *G. haemolysans*'ın etken olduğu ampiyem olgularında da predispozan faktörler bulunmaktadır^(10,14).

Gemella haemolysans penisilin, ampisilin, klindamisin, rifampin ve vankomisin dâhil olmak üzere antimikrobiyal ajanlara genellikle duyarlı iken, bazı izolatlar trimetoprim ve aminoglikozidlere dirençli olabilir⁽⁶⁾. Sunduğumuz olgumuzda ise yapılan antibiyogramda amoksisilin/klavulonik asit, ampisilin/sulbaktam, tetrasiklin, seftazidime, siprofloksasin ve levofloksasine dirençli, imipeneme duyarlı bulunmuştur. Bu antibiyogram sonucu üzerine verilen imipenem tedavisi ile ampirik olarak başlanan piperasilin/tazobaktam tedavisi ile elde edilemeyen klinik ve radyolojik iyileşme sağlanmıştır. Sunduğumuz olguda dikkati çeken esas durum,

belirli zaman aralıkları ile üç ardışık kültürde de *G. haemolysans*'ın izole edilmesi bu bakterinin ampiyem etkeni olduğunu doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, *G. haemolysans*, ender bir patojen olmakla birlikte, özellikle predispozan faktörlerin varlığında ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Ender de olsa bu bakterinin ampiyem etiyojisinde rol oynayabileceği ve antibiyotik duyarlılığının kesinlikle araştırılması gerektiği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Thjötta T, Böe J. *Neisseria haemolysans*. A haemolytic species of *Neisseria* Trevisan. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1938; 37(Suppl):S527-31.
2. Berger U. A proposed new genus of Gram-negative cocci: *Gemella*. *Int Bul Bacteriol Nom Tax* 1961; 11:17-9.
3. Reyn A, Genus V. *Gemella* Berger. In: Buchanan RE, Gibbons NE, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Edn. Baltimore: Williams&Wilkins Co, 1974; 516-7.
4. Reyn A, Birch-Anderson A, Berger U. Fine structure and taxonomic position of *Neisseria haemolysans* (Thjotta and Boe, 1938) or *Gemella haemolysans* (Berger, 1960). *Acta Path Microbiol Scand* 1970; 78: 375-89.
5. Stackebrandt E, Wittek B, Seewaldt E, Schleifer KH. Physiological, biochemical and phylogenetic studies on *Gemella haemolysans*. *FEMS Microbiol Lett* 1983; 13:361-5.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1982.tb08288.x>
6. Berger U. Prevalence of *Gemella haemolysans* on the pharyngeal mucosa of man. *Med Microbiol Immunol* 1985; 174:267-74.
<https://doi.org/10.1007/BF02124811>
7. Martha B, Duong M, Buisson M et al. Acute *Gemella haemolysans* spondylodiscitis in an immunocompetent patient. *Presse Med* 2003; 32:1273-5.
8. Raman SV, Evans N, Freegard TJ, Cunningham R. *Gemella haemolysans* acute postoperative endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:1192-3.
<https://doi.org/10.1136/bjo.87.9.1192-a>
9. Khan R, Urban C, Rubin D, Segal-Maurer S. Subacute endocarditis caused by *Gemella haemolysans* and a review of the literature. *Scand J Infect Dis* 2004; 36:885-8.
<https://doi.org/10.1080/00365540410024916>
10. Aibar-Arregui MÁ, De Escalante-Yangüela B, Garrido-Buenache A, Navarro-Aguilar ME, Montoya-Arenas J, Roderro-Roldán Mdel M. Pleural empyema due to *Gemella* spp: report of 12 cases. *Rev Med Chil* 2012; 140:1544-7.
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872012001200004>
11. Lee MR, Lee SO, Kim SY, Yang SM, Seo YH, Cho YK. Brain abscess due to *Gemella haemolysans*. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2338-40.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2338-2340.2004>
12. Frésard A, Michel VP, Rueda X, Aubert G, Dorche G, Lucht F. *Gemella haemolysans* endocarditis. *Clin Infect Dis* 1993; 16:586-7.
<https://doi.org/10.1093/clind/16.4.586>
13. Gatibelza ME, Laroye B, Lombard J, Mameli A, Thomas E. Management of a ruptured infected abdominal aortic aneurysm and a spondylodiscitis due to *Gemella haemolysans*. *Ann Vasc Surg* 2009; 23:536.e13-7.
<https://doi.org/10.1016/j.avsg.2008.10.010>
14. Veziris N, Fuhrman C, Chouaid C, et al. Empyema of the thorax due to *Gemella haemolysans*. *J Infect* 1999; 39:245-6.
[https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(99\)90061-0](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(99)90061-0)
15. CLSI. 2005. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Approved Standard. CLSI Document M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2005.
16. Woo PC, Lau SK, Fung AM, Chiu SK, Yung RW, Yuen KY. *Gemella* bacteraemia characterised by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *J Clin Pathol* 2003; 56:690-3.
<https://doi.org/10.1136/jcp.56.9.690>

YAZARLARA BİLGİ

- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin yayın organı olup ilgili alanlardaki özgün araştırma, derleme, olgu sunumu, bilimsel haberler, bilimsel kitap ve dergi tanıtım yazıları ile okuyucu mektuplarını yayımlayan hakemli bir dergidir.
- Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık olmak üzere üç ayda bir çıkar ve dört sayıda bir cilt tamamlanır.
- Yazılar Türkçe olarak yollanmalıdır.
- Yazıların sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yayımlanması istenen metnin dayandığı çalışma, daha önce bir yerde yayımlanmamış ya da yayımlamak üzere teslim edilmiş veya kabul edilmiş olmamalıdır. Özet biçiminde yayımlanmış bir ön bildirinin bitmiş biçimine yer verilebilir.
- Dergiye gönderilen yazılar, ilk olarak dergi standartları açısından incelenir. Derginin istediği forma uymayan yazılar, daha ileri bir incelemeye gerek görülmeksizin yazarlarına iade edilir. Bu nedenle gereksiz yere zaman ve emek kaybına yol açılmaması için, yazı sahipleri dergi kurallarını dikkatli incelemek zorundadır.
- Dergi kurallarına uygunluğuna karar verilen yazılar 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 yapıldıkça, 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: tmcddeditor@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.

