Cilt / *Volume* 47
Sayı / *Number* 4
Aralık / *December* 2017

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- Güncel Literatür Işığında Kene Kaynaklı Viral Patojenlere Genel Bir Bakış
- Kan Kültürlerinden ve Diğer Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Suşlarının Salgısal Asit Proteinaz, Fosfolipaz Aktivitesi ve Slime Üretiminin Karşılaştırılması
- *Trichosporon* Türlerinin Tanımlanmasında Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOLF MS) Sisteminin API ID 32C ve VITEK 2 ile Karşılaştırılması

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 47

Sayı / *Number* 4

Aralık / *December* 2017

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 47 Sayı / *Number* 4 Aralık / *December* 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; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

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

Danışmanlar Kurulu / *Advisory Board*

Özlem Kurt Azap, Ankara
M.Altay Atalay, Kayseri
Banu Bayraktar, İstanbul
Cengiz Çavuşoğlu, İzmir
Gülden Çelik, İstanbul
Tülin Demir, Kırşehir
Bora Doğan, Antalya
Aylin Döğen, Mersin
Beyza Ener, Bursa
Şafak Ermertcan, İzmir
Zayre Erturan, İstanbul
Dolunay Gülmez, Ankara
Şaban Gürcan, Edirne
Süleyha Hilmioğlu Polat, İzmir
Selçuk Kaya, İzmir
Mine Hoşgör Limoncu, İzmir
Dilek Yeşim Metin, İzmir
İpek Mumcuoğlu, Ankara
Derya Mutlu, Antalya
Müşerref Tatman Oktun, Çanakkale
Barış Otlu, Malatya
M.Dilara Öğünç, Antalya
Mehmet Özdemir, Konya
Tuncer Özekinci, Diyarbakır
Mustafa Özyurt, İstanbul
M.Nedim Sultan, Ankara
Fatih Şahiner, Ankara
Şinasi Taner Yıldıran, Ankara
Pınar Işkın Zarakolu, Ankara

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: tmcdeditor@gmail.com
www.tmc-online.org

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

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

Copyright © 1993 **Yayın Türü:** Yerel Süreli

Basım Yeri / *Printed by*

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

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

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ
JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 47 Sayı / *Number* 4 Aralık / *December* 2017

İÇİNDEKİLER / *CONTENTS*

DERLEME / *REVIEW*

- **Güncel Literatür Işığında Kene Kaynaklı Viral Patojenlere Genel Bir Bakış**
  An Overview of Tick-Borne Viral Pathogens in the Light of Current Literature
  Osman AKTAŞ, Hakan AYDIN **151-159**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / *CLINICAL INVESTIGATIONS*

- **Kan Kültürlerinden ve Diğer Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Suşlarının Salgısal Asit Proteinaz, Fosfolipaz Aktivitesi ve Slime Üretiminin Karşılaştırılması**
  Comparison of Secretory Acid Proteinase, Phospholipase Activity, and Slime Production in Candida parapsilosis Complex Strains Isolated from Blood Cultures and Other Clinical Samples
  Nejla CEBECİ GÜLER, İlknur TOSUN **160-168**

- ***Trichosporon* Türlerinin Tanımlanmasında Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Sisteminin API ID 32C ve VITEK 2 ile Karşılaştırılması**
  Comparison of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight (MALDI-TOF MS) with API ID 32C and VITEK 2 For the Identification of Trichosporon Species
  Süleyman PELİT, Gonca ERKÖSE GENÇ, Ayşe BARIŞ, Zayre ERTURAN **169-175**

- **Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Direnç Sağlayan Gen Mutasyonlarının ve Direnç Genlerinin Araştırılması**
  The Evaluation of Resistance Genes and Gene Mutations in Quinolone Resistant Escherichia coli and Klebsiella spp. Isolates
  Oya PAZARLI, Füsun CÖMERT, Canan KÜLAH, Elif AKTAŞ, Füruzan KÖKTÜRK **176-184**

- **Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda Varisella Zoster Virüs Serolojik Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi**
  Evaluation of Varicella Zoster Virus Serologic Test Results in Patients Admitted to Ege University Faculty of Medicine
  Münevver KAYIN, Çağla Yıldız ALAGÖZ, Ayşın ZEYTİNOĞLU, İmre ALTUĞLU **185-189**

- ***Acinetobacter* spp. Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Epidemiyolojisi**
  Molecular Epidemiology of Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of Acinetobacter spp
  Murat TELLİ, Mete EYİGÖR, Berna KORKMAZGİL, Neriman AYDIN, Mustafa Altay ATALAY **190-196**

- **Mersin İlindeki Akciğer Dışı Tüberküloz Olgularının Mikrobiyolojik ve Demografik Olarak Değerlendirilmesi**
  Microbiologic and Demographic Evaluation of Extrapulmonary Tuberculosis Cases in Mersin Province
  Gönül ASLAN, Mahmut ÜLGER, Nuran DELİALİOĞLU, Zehra Feza OTAĞ, Duygu DÜŞMEZ APA, Gülden ERSÖZ, Oğuz KÖKSEL, Erdal DORUK, Necdet KUYUCU, Cengiz ÖZCAN, Gürol EMEKDAŞ **197-204**

- **Yenidoğan Dışı Menenjit Şüpheli Hastalarda Bakteriyel Menenjit Etkenlerinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması**
  Investigation of Bacterial Meningitis Agents from Patients with Suspicion of Non-Neonatal Meningitis by Convertional and Molecular Methods
  Mehmet YARYÜZLÜ, Gönül ASLAN, Mahmut ÜLGER, Seda TEZCAN ÜLGER, Gürol EMEKDAŞ, Necdet KUYUCU, Ali KAYA **205-212**

DİZİN ..... **V-VIII**

YAZARLARA BİLGİ ..... **IX-X**

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):151-159, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.151

Derleme

Güncel Literatür Işığında Kene Kaynaklı Viral Patojenlere Genel Bir Bakış

Osman AKTAŞ*, Hakan AYDIN**
**Atatürk Üniversites Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum*
***Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum*

ÖZ

Arachnida sınıfındaki Ixodoidea süperailesinin üyeleri olan keneler memeli, kuş, sürüngen ve amfibilerin kanıyla beslenen karasal organizmalardır. Kenelerin konak kanıyla beslenmeleri sırasında aldıkları enfeksiyöz organizmalar tükürük bezlerine, ovaryumuna, yumurtalarına ve larvalarına geçebilmektedir. Kene kaynaklı viral hastalık etkenlerinin tümü Arbovirüsler içinde yer alır. Bu virüslerden Heartland virus Amblyomma americanum adlı keneler tarafından taşınmakta ve çoklu organ yetmezliği ile ölüme neden olabilmektedir. "Trombositopeni sendromlu yüksek ateş virüsünün" majör vektörü Haemaphysalis longicornis türü kenelerdir. Nörolojik hastalıklara neden olan "Kene kaynaklı ensefalit virüsü", Powassan virus ve Louping hastalığı virüsü Ixodes türleri tarafından insanlara bulaştırılır. Hyalomma cinsi keneler tarafından taşınan "Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsü" tüm dünyada yaygın olan bir virüstür. Sinir sistemini etkileyen Omsk hemorajik ateş virüsü ve hematopoetik hücreleri etkileyen "Colorado kene ateşi virüsü" Dermacentor spp. ile taşınırlar. Bu virüslerin hepsi bireysel ve toplumsal risk oluşturan biyogüvenlik düzeyi yüksek ajanlardır. Bu nedenle klinik örneklerle çalışırken dikkatli olunması gerekir. Bu derleme makalesinde, yukarıda sözü edilen kene kaynaklı viral patojenler hakkındaki mevcut bilgiler güncel kaynaklar ışığında sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Kene kaynaklı virüsler, Heartland virus, Kırım Kongo hemorajik ateşi*

ABSTRACT

An Overview of Tick-Borne Viral Pathogens in the Light of Current Literature

Ticks, the members of the superfamily Ixodoidea in the class Arachnida are terrestrial organisms that feed with the blood of mammals, birds, reptiles and amphibians. Infectious organisms being taken by ticks during feeding with host blood pass into the salivary glands, the ovaries, the eggs and the larvae of them. All of the tick-borne viral disease agents are examined within arboviruses. "Heartland virus", one of these viruses, is transmitted by Amblyomma americanum ticks and can cause multiple organ failure and death. The major vector of "Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus" is Haemaphysalis longicornis. "Tick-borne encephalitis virus", "Powassan virus" and "Louping ill virus" which cause neurological diseases are transmitted to humans by Ixodes spp. "Crimean-Congo hemorrhagic fever virus" which is widespread all over the world is transmitted by Hyalomma spp. Omsk virus affecting the nervous system and "Colorado tick fever virus" affecting hematopoietic cells are carried by Dermacentor spp. All of these viruses are high-level biosecurity agents that constitute individual and social risk. For this reason, it is necessary to be careful while working with clinical specimens. In this review paper, the existing information about the tick-borne viral pathogens mentioned above are presented in the light of current literature.

Keywords: *Tick-borne viruses, Heartland virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever*

GİRİŞ

Kenelere ilişkin ilk yazılara kene humması hakkında MÖ 1550 tarihli Mısır papirüslerinde rastlandığı, yazarı bilinen ilk yazıların ise MÖ 800 yılında Homeros tarafından yazıldığı sanılmaktadır[1]. Hastalıklarla ilişkisi yüzyıllar öncesinden bilinen keneler, insan ve hayvanlarda ölümle sonuçlanabilen çeşitli enfeksiyon etkenlerini taşımaları ile günümüze önemini arttırarak gelmişlerdir.

Karasal omurgalı canlı gruplarının tüm sınıflarının zorunlu dış paraziti olan kenelerin tek besin

Alındığı tarih: 21.03.2017
Kabul tarihi: 22.08.2017
Yazışma adresi: Osman Aktaş, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum
Tel: (0442) 231 65 86
e-posta: osaktas@atauni.edu.tr

kaynağı kandır. Ağız kısmını konağın derisi içerisine sokarak onun kanını emer. Yumurta dönemi hariç, yaşam döngüsünde ortaya çıkan tüm formları kanla beslenir. Bu beslenmeleri sırasında bu makalede sunacağımız viral hastalıkların yanı sıra Lyme hastalığı, Q humması, Tularemi, yinelenen ateş, babesiozis ve ehrlichiozis gibi çok sayıda hastalık etkeninin insanlara taşınmasında vektörlük yaparlar[2].

Kenelerin morfolojik özellikleri ve fizyolojik mekanizmaları onların konaklarını seçmelerinde, omurgalı konaklarından kan almalarında, çiftleşmeleri ve üremelerinde kolaylık sağlayan bir yapıda gelişmiştir[2]. Değişik habitatlardaki dağılımlarında farklılıklar olsa da bu eklembacaklılar sıcak ya da soğuk, kurak ya da yağışlı tüm iklim kuşaklarında yaşamaya kusursuz uyum sağlamış canlılardır[3]. Coğrafi olarak yedi bölgeye ayrılmış yurdumuz dağlık ve engebeli yapısıyla, ırmakları, ovaları, ormanları ve bozkırlarıyla, deniz seviyesinden neredeyse 2000 metreye kadar varan yerleşim alanlarıyla çok yağış alan ya da kurak bölgeleriyle ve geniş mağara çevreleriyle kenelerin yaşamı için uygun ekolojik habitatlar içeren bir yapıya sahiptir. Yerleşik bölgelerinde çiftlik ve kümes hayvanlarının; kırsalda yabani hayvanların bolluğu kenelere konak bulmada olanak sağlayan bir durumdur.

Yaygın turizm ve seyahatlerle ve hızlı ulaşım araçlarıyla ya da biyoterörizm gibi kötü niyetli yaklaşımlarla bu patojenlerin hemen her ülkeye taşınma ve oralarda görülme riski vardır. Sonuç olarak, bir diğer biyolojik vektör olan *Anopheles* cinsi sivrisineklerin gemi, tren, uçak gibi araçların kabin ve bagajlarında bir ülkeden endemik olmayan diğer bir ülkeye taşındığı bildirilmektedir[4]. İnsan ve kene temas sıklığının yıllar içinde giderek arttığı belirtilmektedir[5]. Bu makalede insan sağlığını ciddi bir şekilde tehdit eden ve "Heartland virus (HRTV)" ve "Trombositopeni sendromlu yüksek ateş virüsü [Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV)]" gibi bazıları son yıllarda tanımlanan kene kaynaklı viral etkenlerin yanı sıra "kene kaynaklı ensefalit virüsü [Tick-borne encephalitis virus (TBEV)]", "Powassan virus (POWV)", "Louping hastalığı virüsü [Louping ill virus (LIV)]","Kırım-Kongo hemorajik ateşi (KKHA) virüsü [Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV)]", "Omsk hemorajik ateşi virüsü [Omsk haemorrhagic fever virus (OHFV)]" ve "Kolorado kene ateşi virüsü [Colorado tick fever (CTFV)]" hakkında güncel literatür bilgileri özetlenerek sunulmuştur. Bu derleme çalışmasında, yararlandığımız kaynaklar ışığında hazırladığımız Tablo 1'de kenelerle taşınan viral patojenlerin vektörleri, konakları ve coğrafik dağılımları, Tablo 2'de ise kene kaynaklı viral hastalıklarda semptomlar, laboratuvar tanı ve tedavi/aşı durumları verilmiştir.

Heartland virüs (HRTV)

HRTV günümüze yakın bir zaman önce tanımlanan önemli patojenlerden biridir. Virüs 3 segmentli, negatif polariteli tek iplikçikli bir RNA (-ssRNA) virüsüdür[6]. HRTV *Bunyaviridae* ailesinin beş cinsinden biri olup, dünyanın hemen her yerinde görülen Flebovirüs cinsine ait bir patojendir. İlk olarak 2009 yılında, Missouri'de (ABD) lökopeni ve trombositopenisi olan iki çiftçiden izole edilmiştir[7]. Daha sonra *Amblyomma americanum* türü sert kenelerin bu virüsü taşıdığı gösterilmiştir[8]. Daha çok ağaçlıklı alanlarda yaşamayı tercih eden, larval, nimfal ve yetişkin evrelerini farklı konaklarda geçiren (üç-konaklı) kenelerden olan Amblyomma americanum dişilerinin sırtında yıldıza benzer bir benek olması nedeniyle bu kenelere "tek yıldız kenesi (lone star tick)" adı verilmiştir[2]. Bu keneler Missouri'nin kuzeybatısında yaygındır ve Amerika Birleşik Devletleri'nin güneydoğu ve güney orta kesimini aşarak Atlantik kıyılarından Maine'ye kadar uzanır[9].

Bunyaviridae ailesinin Orthobunyavirus,

Tablo 1. Kenelerle taşınan viral patojenlerin vektörleri, konakları ve coğrafik dağılımları.

Virüs	Majör Vektör	Majör Konaklar	Coğrafik dağılımı
HRTV	*Amblyomma americanum*	Rezervuar konağı bilinmiyor.	ABD (Missouri, Tennessee)
SFTSV	*Haemaphysalis longicornis*	Kedi, fare, kirpi maymun, yaklar (İnsanlara kazaren bulaşır.)	Çin, Japonya, Güney Kore
TBEV	*Ixodes ricinus, Ixodes persulcatus*	Ruminantlar, kemiriciler, etoburlar, kuşlar, atlar ve insanlar	Avrupa, Sibirya, Uzakdoğu ülkeleri
POWV	*Ixodes cookei, Ixodes scapularis*	Memeliler, kuşlar, insan	ABD (Kuzeydoğu ve Büyük Göller bölgesi), Kanada, Rusya ve Uzakdoğu
LIV	*Ixodes ricinus*	Koyun, keçi, sığır, kazaren insan	İngiltere, İskoçya ve diğer Avrupa ülkeleri
CCHFV	*Hyalomma* spp.	Sığır, koyun, keçi, kemiriciler, insan	Balkanlar, Afrika, Ortadoğu, Orta Asya, Türkiye (Orta Anadolu bölgesinde sık)
OHFV	*Dermacentor reticulatus*	Kemiriciler, Misk sıçanları, insan	Sibirya
CTFV	*Dermacentor andersoni*	Küçük kemirgenler (fare, gelengi)	Kuzey Amerika, Kanada, Kaliforniya, Kolorado Kayalık Dağlar

Tablo 2. Kene kaynaklı viral hastalıklarda semptomlar, laboratuvar tanı ve tedavi durumu.

Virüs	Semptomlar	Laboratuvar	Tedavi/aşı
HRTV enfeksiyonu	Ateş, yorgunluk, anoreksi, baş ağrısı, bulantı, miyalji, atralji, lökopeni, pıhtılaşma bozuklukları	Viral nükleik asit aranması	Özgün tedavi ya da aşı yok
SFTSV enfeksiyonu	Yüksek ateş, diyare, karın ağrısı, iştahsızlık, yorgunluk, kas ağrısı, lökopeni, karaciğer ve böbrekte hasar, pıhtılaşma bozuklukları, bazen cilt, konjunktiva ve diş etlerinde kanama	Hücre kültürü, Viral nükleik asit tespiti, EIA ile serumda antikor arama, IFA ve serum nötralizasyon testleri	Özgün tedavi ya da aşı yok
TBEV enfeksiyonu	Genelde asemptomatik, menenjit, menengoensefalit, baş ağrısı, ateş	BOS'ta ELISA ile IgG ve IgM aranması	Aşısı var, özgün tedavi yok
POWV enfeksiyonu	Ateş, baş ağrısı, kusma, zayıflık, konfüzyon, koordinasyon bozukluğu, konuşma güçlüğü	Serum ve BOS'ta ELISA ile özgün antikorların aranması	Özgün tedavi ya da aşı yok
LIV enfeksiyonu	Grip benzeri semptomlar, ateş, nefes almada güçlük, sinirlilik, koordinasyon bozukluğu, ataksi	Hücre kültürü, BOS'ta viral antijen ya da nükleik asit; serumda nötralizan antikor aranması	Koyun, keçi ve sığırlar için aşı var, özgün tedavi yok
CCHFV enfeksiyonu	Ateş, miyalji, kas ağrısı, baş dönmesi, boyunda ağrı ve sertlik, sırt ağrısı, fotofobi (ışığa duyarlılık), kusma, ishal, karın ağrısı, depresyon, uykusuzluk, hâlsizlik, taşikardi, ciltte ve iç mukozal yüzeylerde kanamadan kaynaklanan döküntü	ELISA ile serumda özgün IgM, nötralizan antikor aranması; PCR ile viral RNA aranması, kültürde virüs izolasyonu	Tedavi de ribavirin kullanılır, güvenli ve etkili bir aşı yok
OHFV enfeksiyonu	Ateş, baş ağrısı, mide bulantısı, şiddetli kas ağrısı, öksürük ve orta şiddette hemoraji	Serolojik testlerle antijen, dokuda viral RNA aranması	Özgün tedavi ya da aşı yok
CTFV enfeksiyonu	Ateş, titreme, baş ağrısı, göz arkasında ağrı, fotofobi, kas ağrısı, hâlsizlik, karın ağrısı, bulantı-kusma, hepatosplenomegali	Direkt ve indirekt İmmünoflüoresans testleri, kompleman fiksasyon testi, eritrositlerde viral antijen aranması	Özgün tedavi ya da aşı yok

Nairovirus ve *Phlebovirus* cinsine ait türler arthropodlar ile bulaşan ve insan ve/veya hayvan hastalıklarına neden olan virüslerdir[10,11]. Diğer bir cins olan Hantavirus artropod vektörü olmayan esas itibariyle kemirgenlerin virüsleri olup, insanlara aerosollerle taşınırlar[12]. Bu ailenin 1980'lerden beri dünya çapında giderek önem kazandığı belirtilen Tospovirus cinsi ise bitkileri etkileyen ve *Thysanoptera* üyesi böceklerle taşınan virüslerdir[13]. Phlebovirus cinsi içerisinde Rift Vadisi ateşi, kumsineği ateşi, Toscana, SFTS ve Heartland virüslerini içinde barındıran, flebotomin kum sinekleri, sivrisinekler ve sert ve yumuşak keneler dâhil olmak üzere çok sayıda eklembacaklının vektör olduğu, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden etkenler bulunmaktadır[14]. Bu etkenlerden biri olan HRTV, hastalarda, çoklu organ yetmezliği ile hızlı ölüme neden olan geniş çaplı yayılma gösteren bir enfeksiyona neden olur. Fill Ma ve ark.[15]. 2016 yılında yaptıkları çalışmada, birden fazla organ dokusunda bu virüse ait antijen belirleyerek HRTV'nin yayılmacı özelliğini kanıtlamıştır. Heartland virüs enfeksiyonunu önlemek veya tedavi etmek için geliştirilmiş herhangi bir aşı veya ilaç yoktur. Virüsün insanlara bulaşmasında keneler veya diğer eklembacaklılar rol oynadığı için korunmak amacıyla böcek kovucuların kullanılması, dağlık ve ağaçlık alanlarda uzun kollu gömlek ve uzun paçalı pantolon giyilmesi uygundur. Ateş, lökopeni ve trombositopenisi olan, *Ehrlichia* ve *Anaplasma* enfeksiyonu açısından negatif bulunmuş veya doksisiklin tedavisine yanıt vermeyen hastaların Heartland virus enfeksiyonu yönünden dikkate alınması ve test edilmesi önerilmektedir[8].

Trombositopeni sendromlu yüksek ateş virüsü

Henüz Türkçemizde ismi herhangi bir bilimsel çalışmada dillendirilmemiş olan "Trombositopeni sendromlu yüksek ateş virüsü; bazı hastalarda 40°C'den daha yüksek bir ateşe neden olmaktadır. İngilizce "Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus" olarak anılan virüsten ilk olarak 2009 yılında Çin'de şüphe edilmiş ve 2011 yılında izole edilerek varlığı doğrulanmıştır[16]. İnsanlara taşınmasında ana vektörlüğünü *Haemaphysalis longicornis* türü kenelerin yaptığı bu virüse atıfta bulunmak için literatürde önceleri "trombositopeni sendromu virüsü" adı kullanılmıştır. Hastalarda ortaya çıkardığı klinik bulguları ve genetik yapısının Heartland virüsüne çok benzediği belirtilmektedir[17]. Bunyaviridae ailesine yeni katılan bu virüs *Phlebovirus* cinsi içerisinde yer almaktadır. Ailenin diğer üyeleri gibi negatif zincirli üç RNA segmenti içerir. Büyük segmenti L viral transkripsiyon ve replikasyonda rol oynayan RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRP) enzimini kodlar, orta büyüklükteki M segmenti bağışıklık ile ilgili olan ve "glikoprotein n" (Gn) ile "glikoprotein c" (Gc)'yi kodlayan bölgedir; diğerlerinden küçük olan S segmenti ise virüsün nükleoproteinleri (Np) ve yapısal olmayan proteinlerini (NSs) kodlar[18].

Esas itibariyle bahar ve yaz aylarında *Haemaphysalis* cinsine ait kenelerin ısırıkları sonrasında ya da SFTS'li hastaların vücut sıvılarıyla temas sonrasında ortaya çıkan hastalık ani bir ateş, trombositopeni, kanama eğilimi ve gastrointestinal semptomlarla kendini gösterir. Çin, Güney Kore ve Japonya'ya özgü olduğu belirtilen bu virüsün neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanan ölüm oranı yüksek olduğu gibi bulaşıcılığı da yüksektir[19]. Geliştirilmiş herhangi bir aşısı veya özgün bir tedavisi olmayan hastalığın ileri evrelerinde çoklu organ bozuklukları ortaya çıkabilmektedir. Bu virüsle enfekte kişilerde ölüm oranının %12-30 arasında değiştiği, bu rakamın Japonya'da %55'e kadar yükseldiği belirtilmiştir[20]. Hasta serumundaki viral RNA seviyesi hastalığın klinik seyir hakkında önemli ipuçları verir. Ölümcül olgularda vireminin mL başına 109 viral kopyaya kadar yükseldiği, iyileşme evresinde viremi seviyelerinin düştüğü ve klinik laboratuvar parametrelerinin

normalleştirildiği görülür[19]. SFTS ve diğer bulaşıcı hastalıklara, özellikle semptomlar spesifik olmadığında klinik olarak mikrobiyolojik testler olmadan tanı koymak zordur. SFTS tanısı için konvansiyonel reverz transkripsiyon-PCR (RT-PCR), kantitatif RT-PCR ve diğer genom amplifikasyona dayalı yöntemler ya da viral Ag'lerin saptanması için sandviç ELISA yönteminin kullanılabileceği belirtilmiştir[19]. Günümüzde SFTSV'nin laboratuvar tanısı çeşitli hücre kültürlerinde virüs izolasyonu, nükleik asit belirlenmesi ve serumda antikor arama yöntemleriyle yapılmaktadır. Nükleik asit tespiti diğer yöntemlere göre kısmen daha pahalı olsa da erken tanı için uygundur. Viral nükleik asit genellikle hastalığın başlangıcından 2 hafta sonra, hastalığın akut döneminde hastalardan alınan serum örneklerinde saptanabilir. Virüse özgü IgM, IgG antikorları "in-house Mac-EIA", indirekt EIA ve çift antijen sandviç EIA testleri ve ayrıca indirekt immünofluoresans (IFA) ve serum nötralizasyon testleri ile araştırılır[21].

İlk kez Çin'in kırsal yörelerinde tanımlanan daha sonra bu ülkenin 11 ilinde yüksek mortalite oranıyla kendini gösteren SFTS daha sonra Japonya ve Kore'de gözlenmiş ve artık dünyanın başka yerlerinde de halk sağlığı yönünden önemli bir risk hâline gelmiştir[22].

Kene kaynaklı ensefalit virüsü

İngilizcede adı Tick-borne encephalitis virüs (TBEV) olan "kene kaynaklı ensefalit virüsü" Flaviviridae familyasına ait tek sarmallı bir RNA virüsüdür[23]. Olgun viriyonlar yaklaşık 50 nm çapındadır ve E (zarf) ve M (membran) olmak üzere iki zarf glikoproteini içeren lipid çift katmanı ile çevrelenmiş bir elektron yoğun çekirdekten oluşur[24].

Ülkemizde bildirimi zorunlu hastalıklardan biri olan "kene kaynaklı ensefaliti" (TBE)'nin Avrupa'da en sık gözlenen kene ısırması sonucu ortaya çıkan viral enfeksiyon olduğu ve etkenin coğrafik farklılıklarına göre tümü nörotropik olan Avrupa TBEV (TBEV-Eur), Sibirya TBEV (TBEV-Sib) ve Uzak Doğu TBEV (TBEV-FE) olmak üzere 3 alt tipinin bulunduğu belirtilmiştir[23]. Konağın merkezi sinir sistemine saldıran bu virüs insanda ölüme neden olabilmektedir. Zoonotik bir patojen olan TBEV'nin omurgalı konakları küçük memeliler ve kemirgenlerdir. Ana vektörlüğünü yapan keneler Avrupa'da *Ixodes ricinus*; Sibirya ve Uzakdoğu'da ise *Ixodes persulcatus*'tir[25].

Virüsün patogenezi hakkındaki bilgilerin çoğu diğer flavivirüslerle ilgili çalışmalardan elde edilmiştir. Diğer laboratuvar sonuçları nonspesifik olduğundan tanı mikrobiyolojik bulgularla onaylatılmalıdır. Kene kaynaklı ensefalit virüsü enfeksiyonunun rutin laboratuvar tanısı genellikle beyin omurilik sıvısında virüse özgü IgM ve IgG antikorlarının ELISA yöntemi ile belirlenmesiyle yapılır. Hastalığın spesifik bir antiviral tedavisi yoktur. Kene kaynaklı ensefalitin endemik olduğu alanlarda yaşayanlar ya da o alanları ziyaret edenler için uygulanan aşılama ile hastalıktan korunmak olasıdır[26].

Powassan virus (POWV)

Nörotropik özellikte olan POWV zarflı, pozitif polariteli ve Flavivirus cinsine ait tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Zarf (E) glikoprotinlerine karşı organizmada oluşan antikorların nötralizan etkisi vardır.

Esas konakları fareler ve tarla fareleri olan POWV'nin diğer konakları arasında dağ sıçanları, sincaplar, beyaz ayaklı fare, beyaz kuyruklu geyik gibi hayvanlar yer almaktadır. Vektörleri ise *Ixodes scapularis, Ixodes cookie, Ixodes marxi, Ixodes spinipalpus* ve *Dermacentor andersoni* gibi sert kenelerdir[27,28]. Powassan virus enfeksiyonları bu kenelerin yaygın olduğu Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Rusya'da

görülür[29]. İlk olarak Kanada'da 1958 yılında keşfedilen ve insidansı Kuzey Amerika'da artmaya devam eden POWV'nin insanlarda semptomatik bir hastalığa ender olarak neden olduğu ancak semptomatik olduğunda neredeyse her zaman ciddi ensefalit olarak kendini gösterdiği belirtilmektedir[30]. Enfekte kenelerle insana bulaşan POW virüsünün % 10'un üzerinde olgu ölüm hızı ile ciddi bir nöroinvaziv hastalığa neden olabildiği dile getirilmektedir[31]. POWV enfeksiyonlarının tanısı kan ve omurilik sıvısının biyokimyasal değerleri ile enfeksiyona karşı oluşan antikorların tespitine yönelik laboratuvar testlerinin birleşimi ile konulur.

POWV enfeksiyonlarından korunmada kene kovucu maddeler kullanmak, ormanlık ve ormanlık alanlarda uzun kollu gömlek ve pantolon giymek etkili olmaktadır.

Louping ill virüs (LIV, Louping hastalığı virüsü)

LIV, genetik ve antijenik olarak TBEV ile yakın ilişkisi olan ve özellikle koyunlarda ve orman tavuklarında hastalık ve ölüme neden olarak ekonomik açıdan önem taşıyan bir flavivirüstür[32]. Bu virüslerin konaklarına taşınmasında Avrupa'da *Ixodes ricinus* vektörlük yapar. Koyunların hastalığı olarak bilinen Louping hastalığı ender olarak insanlarda da görülmektedir. İlk insan enfeksiyonu 1934 yılında bildirilmiştir[33]. Hastalık koyun çobanlığı yapan, mezbahalarda koyun kesimi ile ilgilenen kişilerde hayvan sağlığı ile ilgili meslek gruplarında ya da laboratuvar çalışanlarında görülmüştür[34]. LIV enfeksiyonları yalnızca koyun ve insanlarla sınırlı olmayıp sığır, keçi, domuz, at, geyik, dağ tavşanı ve orman tavuğu da dâhil olmak üzere çeşitli çiftlik ve yabani hayvan türlerini de enfekte ettiği belirtilmektedir[35].

Virüsün vektörleri *Ixodes ricinus* olup konakları koyunlardır. Bu virüsün enfeksiyonları bu kenelerin görüldüğü İngiltere, İskoçya ve diğer Avrupa ülkelerinde yaygındır[33]. Ağırlıklı olarak ormanlık alanlarda bulunan ve küçük kemirgenlerin rezervuarlığını yaptığı Batı TBEV'den farklı olarak, LIV genellikle küçük kemirgenler tarafından değil, koyun, orman tavuğu ve dağ tavşanları tarafından bulaştırılmaktadır[32].

Kırım-Kongo hemorajik ateşi virüsü (Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, CCHFV)

Kırım-Kongo hemorajik ateşi (KKHA), ilk kez 1944'te Kırım'da tanımlandığı için hastalık bir süre "Kırım hemorajik ateşi'' adıyla anılmış sonraki yıllarda Kongo'da da tanımlanmış olduğundan hastalığın adı KKHA olarak değiştirilmiştir[36]. KKHA etkeni CCHFV zarflı, negatif polariteli ve üç segmentten oluşan tek iplikçikli bir RNA virüsüdür. Büyük segmenti viral polimeraz enzimini, orta büyüklükteki segmenti zarf proteinlerini ve küçük segmenti ise viral nükleokapsidi kodlayan parçalardır.

CCHFV yurdumuzda yaptığı enfeksiyonlarla çok sayıda olgu bildiriminin yapıldığı virüslerden biridir. Viral kanamalı ateşlerin öldürücülüğü yüksek zoonotik karakterli hastalıklar olduğunu belirten Uğurlu ve ark.[37] bu hastalıklar içinde yurdumuz için en önemli olanının KKHA olduğunu vurgulamışlardır. Virüsün vektörleri *Hyalomma* cinsine ait kenelerdir. Konakları arasında sığır, koyun keçi, kemirgenler, tavşan ve kuşlar yer almaktadır. KKHA bu kenelerin görüldüğü Doğu Avrupa, Afrika, Ortadoğu ve Orta Asya ülkelerinde yaygındır[38]. KKHA'ya neden olan Nairovirusların vektörlüğünü yapan *Hyalomma anatolicum, H. marginatum, H. detritum, H. dromedarii, H. excavatum H. turanicum* yurdumuzda sıklıkla bulunan türlerdir.

CCHFV kenelerin ısırması ile ya da enfekte viremik hayvanların kesilmesi sırasında hayvan

kanı ve dokuları ile temas sonucu bulaşabildiği gibi nozokomiyal olarak da bulaşabilmektedir[39]. Hastalığın etkili bir aşısı ve özel bir antiviral tedavisi yoktur[40,41]. Bu nedenle hastalığın mortalite oranının % 10–60'a kadar ulaşabildiği bildirilmektedir[38]. Dünya Sağlık Örgütü özel bir tedavisi olmayan hastalığın tedavisinde ribavirin kullanılması önermektedir[42]. Bodur ve ark.[43] 2004 yılında yayınladıkları ve KKHA'lı iki olguyu sundukları çalışmalarında, ülkemizde o zamanlar yeni tanımlanan bu hastalığa dikkat çekmişler ve hastalardaki yakınmaların yüksek ateş, baş ağrısı, cilt ve mukozalarda kanama, ishal, bulantı-kusma olduğunu rapor etmişlerdir[43]. Hastalığın kuluçka süresi enfekte kenenin ısırmasını takiben daha kısa (genellikle 1-3 gün) buna karşın enfekte kan, salgı ve diğer dokularla temas durumuna göre bu süre daha uzun (genellikle 5-6 gün) olmaktadır[39].

Güvenli ve etkili bir aşısı bulunmayan KKHA'dan korunmak için akarasitlerle kenelerin kontrolü gerekir. Ayrıca endemik bölgelerde kenelerin yaygın bulunduğu alanlardan kaçınılması, giysilerin ve vücudun kene yönünden kontrol edilerek varsa kenelerin çıkarılması alınacak önlemlerdendir. Klinik örneklerin işlenmesinde çalışan tüm personelin laboratuvar güvenlik önlemlerine eksiksiz uymalıdır.

Omsk hemorajik ateşi virüsü (Omsk haemorrhagic fever virus, OHFV)

Omsk hemorajik ateşi (OHF) *Flaviviridae* ailesinde yer alan B grubu arboviruslerin neden olduğu ve özellikle Rusya'da Batı Sibirya'nın bazı bölgelerinde görülen akut bir arboviral hastalıktır[44]. OHFV'nin yerleştiği bölgelerde hasarlar ve orta şiddette kanamalarla özelliklenen bu hastalığın belirtileri arasında ateş, hâlsizlik, baş ağrısı, mide bulantısı, şiddetli kas ağrısı ve öksürük vardır. OHF'nin primer hedefi sinir sistemi olup, hastaların 1/3'inde pnömoni, nefroz, menenjit ya da bu komplikasyonların bir kombinasyonu ortaya çıkar. Mevcut tek tedavi semptomların kontrolüne yöneliktir. Özgün bir aşısı bulunmamaktadır. TBE'ye karşı kullanılan aşılar Omsk hemorajik ateş virüsüne karşı da kullanılarak çapraz bağışıklama yoluyla koruma sağlanabilmektedir[45]. Virüs çoğunlukla *Dermacentor reticulatus* keneleri tarafından taşınır, ancak insanlar esas olarak enfekte misk sıçanları (*Ondatra zibethicus*) ile temastan sonra enfekte olur. Misk sıçanları Omsk hemorajik ateş virüsüne karşı çok duyarlı hayvanlardır. Bu türün 1930'larda Sibirya'ya girmesi olasılıkla daha önce bu bölgede bulunmayan OHF'nin bu bölgeye girmesine yol açmıştır[44].

Dermacentor reticulatus'un yüksek üreme hızı, hayatta kalma ve değişken habitatlar içinde yayılma yeteneğiyle, misk sıçanları, tarla fareleri başta olmak üzere 60'ın üzerinde farklı vahşi ve evcil hayvanları konak olarak kullanmasıyla sıra dışı özellikleri olan kusursuz bir biyolojik vektör olduğu belirtilmektedir[46].

Kolorado kene ateşi virüsü

İngilizce "Colorado tick fever (CTF)" adıyla bilinen Kolorado kene ateşi *Reoviridae* ailesinde *Coltivirus* cinsinin bir türü olan CTFV tarafından oluşturulan, hemopoietik hücreleri, özellikle eritrositleri tutan bir enfeksiyondur. Virüsün eritrositleri enfekte etmesi onun kan nakli yoluyla bulaşma riskinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Çoğu zarfsız ancak endoplazmik retikulumdan geçmesi sırasında bazıları zarflanan CTFV ikosahedral nükleokapsit simetrisine sahip 80 nanometre çapında çembersel yapıda bir viriyondur. Çift sarmallı RNA'sı 12 segmentli olup, viral genomu yaklaşık 29 kbp uzunluğundadır[47].

Koltivirüsler, kemirgenlerden, insanlardan ve sert kenelerden izole edilmiştir. CTFV insanlara odun keneleri olarak bilinen *Dermacentor andersoni* ısırığıyla bulaşır. Rakımı 1200-3000

metre arasındaki yerlerde rastlanılan hastalığın kuluçka süresi, kene ısırmasından sonra yaklaşık 3-5 gün kadar sürer[48]. Hastalığın insandan insana bulaştığını gösteren herhangi bir kanıt gösterilememiştir. Ancak ender olarak kan nakline bağlı olarak hastalığın bulaştığı olgular bildirilmiştir. CTFV, Kuzeybatı Amerika'da (Kolorado, Kaliforniya ve "Kayalık Dağlar" bölgesinde) endemiktir ve daha çok ilkbahar aylarında görülen hastalığı ateş, titreme, baş ağrısı ve hâlsizlik gibi belirtilerle karakterizedir[49]. Hastalığın özgün bir antiviral tedavisi ya da aşısı yoktur.

Sonuç olarak, CTFV enfeksiyonu tanısında kanda lökopeni, trombositopeni saptanması ve periferik yaymada tipik olmayan eritrositlerin gösterilmesi önemli kriterlerdir. Kan ve BOS'tan virüs izolasyonu zaman alıcılığı ve enfeksiyonun ilk haftasında kanda reverz transkriptaz-PCR ile viral nükleik asit aranması pahalı oluşu ile pratik değildir. Enfeksiyondan 10-14 sonra indirekt immünoflüoresans antikor (İFA), nötralizasyon, kompleman fiksasyon ve ELISA ve testleri ile antikor aranması uygundur[50].

KAYNAKLAR

1. **Anderson JF.** The natural history of ticks. *Med Clin North Am* 2002; 86:205-18. https://doi.org/10.1016/S0025-7125(03)00083-X
2. **Aktaş O.** Tıbbi Artropodoloji. Eser Basın Yayın Dağıtım Matbaacılık, Erzurum, 2014: 151-2.
3. **Anderson JF, Magnarelli LA.** Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 2:195-215. https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006
4. **Zoller T, Naucke TJ, May J, et al.** Malaria transmission in non–endemic areas: case report, review of the literature and implications for public health management. *Malar J* 2009; 8:71. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-71
5. **Leiby DA, Gill JE.** Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats. *Transfus Med Rev* 2004; 18:293-306. https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2004.07.001
6. **Klimentov AS, Butenko AM, Khutoretskaya NV, et al.** Development of pan-phlebovirus RT-PCR assay. *J Virol Methods* 2016; 232:29-32. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.02.009
7. **Bosco-Lauth AM, Calvert AE, Root JJ, et al.** Vertebrate host susceptibility to Heartland Virus. *Emerg Infect Dis* 2016; 22:2070-7. https://doi.org/10.3201/eid2212.160472
8. **Pastula DM, Turabelidze G, Yates KF, et al.** Heartland virus disease - United States, 2012-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63:270-1.
9. **McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, et al.** A New phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *Engl J Med* 2012; 367:834-41. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203378
10. **Hart TJ, Kohl A, Elliott RM.** Role of the NSs protein in the zoonotic capacity of Orthobunyaviruses. *Zoonoses Public Health* 2009; 56:285-96. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01166.x
11. **Savage HM, Godsey MS Jr, Lambert A, et al.** First detection of heartland virus (Bunyaviridae: *Phlebovirus*) from field collected arthropods. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89:445-52. https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0209
12. **Polat C, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacıoğlu H, Öktem MA.** Yabani kemiricilerde eski Dünya Hantavirus IgG antikorlarının saptanması için ELISA ve immünoblot yöntemlerinin optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:245-55. https://doi.org/10.5578/mb.23161
13. **Oliver JE, Whitfield AE.** The Genus Tospovirus: Emerging bunyaviruses that threaten food security. *Annu Rev Virol* 2016; 3:101-24. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055036
14. **Wuerth JD, Weber F.** Phleboviruses and the Type I interferon response. *Viruses* 2016; 8:E174. https://doi.org/10.3390/v8060174
15. **Fill MA, Compton ML, McDonald EC, et al.** Novel clinical and pathologic findings in a Heartland Virus-associated death. *Clin Infect Dis* 2017; 64:510-2.
16. **Wu Y, Gao GF.** Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus expands its borders. *Emerg Microbes Infect* 2013; 2:e36. https://doi.org/10.1038/emi.2013.36
17. **Godsey MS Jr, Savage HM, Burkhalter KL, Bosco-Lauth AM, Delorey MJ.** Transmission of Heartland Virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) by experimentally infected *Amblyomma americanum* (Acari: *Ixodidae*). *J Med Entomol* 2016; pii:tjw080 (baskıda). https://doi.org/10.1093/jme/tjw080
18. **Sun Y, Qi Y, Liu C, et al.** Nonmuscle myosin heavy chain IIA Is a critical factor contributing to the efficiency of early infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Virol* 2014; 88:237-48. https://doi.org/10.1128/JVI.02141-13
19. **Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, et al.** Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus antigen detection using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004595. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004595
20. **Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, et al.** Two autopsy cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in Japan: A pathognomonic histological feature and unique complication of SFTS. *Pathol Int* 2014; 64:569-75. https://doi.org/10.1111/pin.12207
21. **Hu CY, Ouyang L, Wang LY, Yu Y, Feng LL, Zhang XJ.** Research advances on epidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome: A systematic review of the literature. *J Infec Dis Treat* 2016; 2:2.

22. **Liu Q, He B, Huang SY, Wei F, Zhu XQ.** Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis. *Lancet Infect Dis* 2014; 14:763-72. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70718-2
23. **Rieille N, Bressanelli S, Freire CC, et al.** Prevalence and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in field-collected ticks (Ixodes ricinus) in southern Switzerland. *Parasit Vectors* 2014; 7:443. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-443
24. **Carletti T, Zakaria MK, Marcello A.** The host cell response to tick-borne encephalitis virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; pii: S0006-291X(17)30267-X. (baskıda)
25. **Tonteri E, Kipar A, Voutilainen L, et al.** The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*). *PLoS One* 2013; 8:e81214. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081214
26. **Bogovic P, Strle F.** Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* 2015; 3:430-41. https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430
27. **Brackney DE, Brown IK, Nofchissey RA, Fitzpatrick KA, Ebel GD.** Homogeneity of Powassan virus populations in naturally infected *Ixodes scapularis*. *Virology* 2010; 402:366-71. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.035
28. **Raval M, Singhal M, Guerrero D, Alonto A.** Powassan virus infection: case series and literature review from a single institution. *BMC Res Notes* 2012; 5:594. https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-594
29. **Pesko KN, Torres-Perez F, Hjelle BL, Ebel GD.** Molecular epidemiology of Powassan virus in North America. *J Gen Virol* 2010; 91:2698-705. https://doi.org/10.1099/vir.0.024232-0
30. **Doughty CT, Yawetz S, Lyons J.** Emerging causes of Arbovirus encephalitis in North America: Powassan, Chikungunya, and Zika viruses. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017;17:12. https://doi.org/10.1007/s11910-017-0724-3
31. **Hermancea ME, Thangamani S.** Tick saliva enhances Powassan Virus transmission to the host, influencing its dissemination and the course of disease. *J Virol* 2015; 89:7852-60. https://doi.org/10.1128/JVI.01056-15
32. **Gilbert L.** Louping ill virus in the UK: a review of the hosts, transmission and ecological consequences of control. *Exp Appl Acarol* 2016; 68:363-74. https://doi.org/10.1007/s10493-015-9952-x
33. **Davidson MM, Williams H, Macleod JA.** Louping ill in man: A forgotten disease. *J Infect* 1991; 23:241-9. https://doi.org/10.1016/0163-4453(91)92756-U
34. **Lawson JH, Manderson WG, Hurst EW.** Louping-ill meningo-encephalitis a further case and a serological survey. *Lancet* 1949; 254:696-9. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(49)91328-8
35. **Zintl A, Moutailler S, Stuart P, et al.** Ticks and Tick-borne diseases in Ireland. *Ir Vet J* 2017; 70:4. https://doi.org/10.1186/s13620-017-0084-y
36. **Çevik MA.** Kırım-Kongo hemorajik ateşi: klinik özellikler. *Klimik Derg* 2004; 17:59-61.
37. **Uğurlu M, Uzun R, Soydal T.** Kırım-Kongo kanamalı ateşinde vaka yönetimi ve izolasyon önlemleri. *Klimik Derg* 2004; 17:65-7.
38. **Ergonul O.** Crimean–Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol* 2012; 2:215-20. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.001
39. **Elaldı N.** Kırım-Kongo hemorajik ateşi epidemiyolojisi. *Klimik Derg* 2004; 17:151-6.
40. **Güneş T.** Kırım-Kongo hemorajik ateşi. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40:279-87.
41. **Taşyaran MA, Özkurt Z.** Kırım-Kongo hemorajik ateşi: tedavi ve korunma. *Klimik Derg* 2004; 17:157-60.
42. **Uzun R, Uğurlu M.** Kırım-Kongo kanamalı ateşinde ribavirin kullanımı. *Klimik Derg* 2004; 17:62-4.
43. **Bodur H, Akıncı E, Çolpan A, Erbay A, Eren S, Çevik MA.** Kırım-Kongo hemorajik ateşi: iki olgu sunumu. *Klimik Derg* 2004; 17:214-5.
44. **Růžek D, Yakimenko VV, Karan LS, Tkachev SE.** Omsk haemorrhagic fever. *Lancet* 2010; 376:2104-13. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61120-8
45. **Gökahmetoğlu S.** Hemorajik ateş etkeni viruslar. *Infeks Derg* 2006; 20:137-44.
46. **Földvári G, Široký P, Szekeres S, Majoros G, Sprong H.** Dermacentor reticulatus: a vector on the rise. *Parasit Vectors* 2016; 9:314. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1599-x
47. **Attoui H, Mohd Jaafar F, de Micco P, de Lamballerie X.** Coltiviruses and Seadornaviruses in North America, Europe, and Asia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1673-9. https://doi.org/10.3201/eid1111.050868
48. **Meagher KE, Decker CF.** Other tick-borne illnesses: tularemia, Colorado tick fever, tick paralysis. *Dis Mon* 2012; 58:370-6. https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.03.010
49. **Napthine S, Yek C, Powell ML, Brown TD, Brierley I.** Characterization of the stop codon readthrough signal of Colorado tick fever virus segment 9 RNA. *RNA* 2012; 18:241-52. https://doi.org/10.1261/rna.030338.111
50. **Johnson AJ, Karabatsos N, Lanciotti RS.** Detection of Colorado tick fever virus by using reverse transcriptase PCR and application of the technique in laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1203-8.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):160-168, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.160

Araştırma

Kan Kültürlerinden ve Diğer Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Suşlarının Salgısal Asit Proteinaz, Fosfolipaz Aktivitesi ve Slime Üretiminin Karşılaştırılması

Nejla CEBECİ GÜLER*, İlknur TOSUN**

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

***Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon*

ÖZ

Amaç: *Yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane kaynaklı kan akımı enfeksiyonlarında Candida türleri en sık dört etkenden biridir. Candida parapsilosis, Candida albicans'tan daha az virülan olarak kabul edilmesine rağmen, son yirmi yılda insidansında en fazla artış görülen Candida türü olmuştur. Çalışmamızda kan ve diğer klinik örneklerden izole edilen C. parapsilosis suşlarının salgısal asit proteinaz (Sap), fosfolipaz enzim aktivitelerinin ve slime üretiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *On sekiz aylık süreçte kan kültürleri ve diğer klinik örneklerden izole edilen 28 C. parapsilosis suşunun asit proteinaz aktivitesi süt tozu agaroz yöntemiyle, fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agar yöntemiyle, slime üretimi ise glukozlu sıvı sabouraud besiyeri ve glukozlu triptik soy broth kullanılarak tüp adezyon yöntemi ile belirlendi.*

Bulgular: *Çalışma izolatlarının tümünde Sap aktivitesi belirlenemedi. Ancak kan ve kan dışı klinik izolatların Sap aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. İzolatların hiçbirinde fosfolipaz aktivitesi belirlenemedi. İzolatların 23'ünde her iki besiyeriyle de slime üretimi görüldü. Yalnızca bir izolat her iki besiyeri ile de slime negatifti. Dört izolatta ise iki farklı besiyeri ile slime üretimi açısından farklı sonuçlar elde edildi. Kan izolatları ile diğer klinik izolatların slime üretimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.*

Sonuç: *C. parapsilosis izolatlarında Sap aktivitesi ve slime üretimi virülans faktörü olarak öne çıkmaktadır. Fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesinde başka yöntemlerin kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Fosfolipaz, Candida parapsilosis, salgısal asit proteinaz, Slime*

ABSTRACT

Comparison of Secretory Acid Proteinase, Phospholipase Activity, and Slime Production in Candida parapsilosis Complex Strains Isolated from Blood Cultures and Other Clinical Samples

Objective: *Candida species comprise one of the four most common agents in hospital-acquired bloodstream infections with high mortality and morbidity. Although C. parapsilosis is accepted as less virulent than C. albicans, it has been the Candida species with the highest increase in incidence within the last two decades. In our study, a comparison is made between the secretory acid proteinase (Sap), phospholipase enzyme activity and the slime production of C. parapsilosis strains isolated from blood with those isolated from other clinical samples.*

Material and Methods: *Sap activity was determined by the milk powder agarose method, phospholipase activity by the egg-yolk agar method and slime production by the tube adhesion method using a liquid Sabouraud medium with glucose and tryptic soy broth with glucose of 28 C. parapsilosis strains isolated from blood cultures and other clinical samples during a period of eighteen months.*

Results: *Sap activity was detected in all the study isolates; however, there was no statistically significant difference in Sap activity between the blood and non-blood clinical isolates. Phospholipase activity was not detected in any of the isolates. In 23 of the isolates, slime production was observed in both media, while only one isolate was slime negative in both culture media. In the remaining four isolates slime production results were different for the two different media. There was no statistically significant difference in slime production between the blood and other clinical isolates.*

Conclusion: *Sap activity and slime production are important virulence factors in the C. parapsilosis isolates. It is considered that methods other than egg-yolk agar may be useful in determining phospholipase activity in C. parapsilosis isolates.*

Keywords: *Phospholipase, Candida parapsilosis, secretory acid proteinase, Slime*

Alındığı tarih: 21.04.2017
Kabul tarihi: 16.06.2017
Yazışma adresi: Nejla Cebeci Güler, Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, B Blok, K:2, Gazipaşa Yerleşkesi, Debboy Mevkii, 28100 Giresun
e-posta: nejlacebeci52@hotmail.com

GİRİŞ

Yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane kaynaklı kan akımı enfeksiyonlarında *Candida* türleri en sık görülen dört etkenden biri olarak karşımıza çıkmaktadır[1]. *Candida parapsilosis, Candida albicans*'tan daha az virülan olarak kabul edilmesine rağmen, 1990'lardan günümüze kadar insidansında en fazla artış görülen *Candida* türü olmuştur. Çok sayıda çalışmada kan kültürlerinden en sık izole edilen ikinci *Candida* türü olduğu rapor edilmiştir. Hatta günümüzde bazı Avrupa, Asya ve Kuzey-Güney Amerika hastanelerinde *C. albicans*'ın önüne geçtiği bildirilmiştir[2]. Ülkemizde de kan kültürlerinden ikinci sıklıkta[3] izole edilen *Candida* türü olduğu bildirilmekle birlikte, ilk sırada[4] yer aldığı da rapor edilmiştir.

Salgısal hidrolitik enzimler *C. albicans*'ın adheransını, doku penatrasyonunu ve dolayısıyla konak invazyonunu kolaylaştıran önemli virülans faktörleridir. Salgısal asit proteinaz (Sap) ve fosfolipaz, karakterize edilmiş bu enzimler arasında en önemlileridir[5-7]. Ancak non-albicans *Candida* türlerinde bu patojenite belirleyicilerinin varlığı büyük oranda belirsizdir.

Araştırmacılar *C. parapsilosis* fungemilerinin artışını, bu organizmanın özellikle kateterlere ve benzeri plastik yüzeylere tutunma eğiliminin yüksek olmasıyla açıklamaktadırlar[8]. Yüzeylere tutunma kapasitesi slime oluşumuyla bağlantılıdır ve slime oluşumu *Candida*'larda böyle enfeksiyonlara yol açan temel faktördür. İzole edilen suşlarda slime oluşumunun gösterilmesi, bir slime odağının olası varlığının ve antimikotik tedavi sırasındaki olası farklılıkların belirleyicisidir[9,10].

Candida'ların virulans faktörlerinin belirlenmesi enfeksiyon etiyolojisindeki rolleri açısından önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda kan ve kan dışı klinik örneklerden izole edilen *C. parapsilo*sis kompleks suşlarının salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitesi ve slime üretimi özelliklerinin değerlendirilmesi, kan ve diğer klinik izolatların bu virülans faktörleri açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar ve kültür besiyerleri. Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'nda on sekiz aylık süreçte kan ve kan dışı klinik örneklerden izole edilen 28 *C. parapsilosis* kompleks suşu dâhil edildi. Yirmi sekiz suşun 15'i kan kültürlerinden, 13'ü diğer klinik örneklerden izole edildi. Kan dışı izolatlar 6 idrar, 2 yara, 1 idrar sondası, 1 yanık, 1 ağız içi lezyon, 1 kulak sürüntüsü ve 1 tırnak izolatından oluşmaktaydı. Çalışma izolatlarında germ tüp testi ile *C. albicans* ve *C. dubliniensis* diğer *Candida*'lardan ayrıldı. Bu türler dışındaki *Candida* türleri API 20C AUX (BioMériux, Fransa) ticari kiti kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı. Suşlar Mısır unu-tween 80 agardaki (Corn Meal Agar, Himedia, Hindistan) mikroskobik görünümleri ve kromojenik agardaki (CHROMagar, BD, ABD) koloni renkleriyle de tanımlandı. *C. parapsilosis* kompleks olarak tanımlanan suşlar gliserollü YEPD sıvı besiyeri (maya özütü %1, pepton %2, dektroz %2, gliserol %20 w/v) içerisinde -80ºC'de saklandı.

Proteinaz aktivitesi. Proteinaz aktivitesi Banerjee ve ark.'nın[11] önerdiği şekilde süt tozu agaroz yöntemiyle belirlendi. Sığır serum albumini (BSA) içeren sıvı besiyeri %0.17 yeast nitrogen base (YNB) w/o aa ve as, %2 glukoz, %0.2 BSA olacak şekilde distile suda hazırlanıp, pH 4.0'a ayarlandıktan sonra 0.45 μm'lik filtre ile steril edilerek steril tüplere 2'şer ml dağıtıldı. Test edilecek suşlardan 107 hücre, BSA sıvı besiyeri içerisine ekim yapıldı ve 30 ºC'de çalkalayıcı su banyosunda 200 rpm'de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda

elde edilen kültür süpernatantları -20 ºC'de saklandı. Süt tozu ilaveli agaroz, %1 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye), %1 agaroz ve 0.114 M sodyum asetat (pH 5.2) tamponu ile hazırlandı ve 1 mm kalınlığında cam plaka üzerine dökülüp katılaşması beklendi. Kültür süpernatantları agaroz üzerine damlatıldı ve oda ısısında 24 saat inkübe edildi. Süt tozu içerisindeki kazeinin parçalanması ile oluşan beyaz zonların çapları ölçülerek, suşların Sap aktiviteleri değerlendirildi. Hiç presipitasyon zonu görülmeyenler suşlar Sap aktivitesi negatif, presipitasyon zonu ≤0.5 cm ise (+), 0.6-0.9 cm ise (++), 1-1.4 cm ise (+++), ≥1.5 cm ise (++++) olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *C. albicans* CBS 2730 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollanda) suşu kullanıldı.

Fosfolipaz aktivitesi. Suşların fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agar kullanılarak belirlendi[12]. Yumurta sarılı agar besiyeri 1.25 g pepton, 2.75 g glukoz monohidrat, 2.5 g agar, 7.3 g sodyum klorit, 0.07 g kalsiyum klorür hekzahidrat 115 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı ve otoklavlanarak steril edildi. Yumurta sarısını hazırlamak için yumurtalar steril koşullarda kırılarak sarısı ayrıldı, üzerine eşit hacimde serum fizyolojik eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantı ayrıldı. On ml süpernatant ile 125 ml sitrik asit disodyum fosfat tamponu (pH: 4.4) ilk hazırlanan besiyerine eklendi ve bu besiyeri petrilere 4 mm kalınlığında döküldü. McFarland standart bulanıklığı 0.5 olan maya süspansiyonunlarından 5 μl, yumurta sarılı besiyeri üzerine değdirilmek suretiyle ekim yapıldı ve 37ºC'de 8 gün inkübe edildi. Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında, kolonin etrafında oluşan halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alındı. Fosfalipaz aktivitesi, koloni çapının koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplandı. Bu sistemde Pz değeri küçüldükçe fosfalipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri, test edilen suşun fosfalipaz aktivitesinin negatif olduğunu göstermektedir. Suşlar Pz değeri 0.9-1.00 ise (+), 0.89-0.8 ise (++), 0.79-0.7 ise (+++), <0.69 ise (++++) olarak değerlendirildi. *C. albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, ABD) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

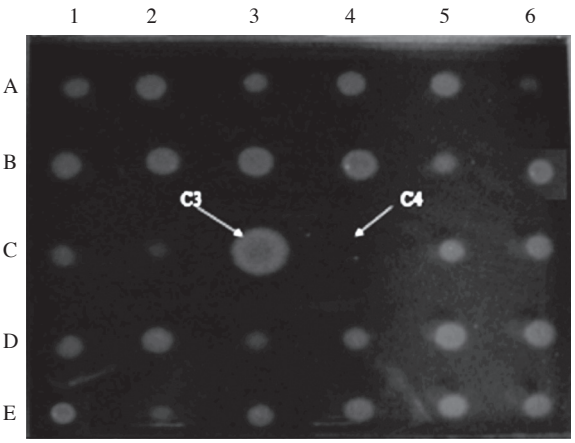
Slime üretimi. Koagülaz negatif stafilokoklarda slime üretiminin belirlenmesi için tanımlanan yöntem esas alındı[13,14]. Glikozlu sıvı Sabouraud besiyeri (GSSB) için 10 g pepton ve 80 g glukoz 1000 ml distile su içinde çözülerek tüplere 5'er ml dağıtıldı. Glikozlu triptik soy broth besiyeri (GTSB) için 17 g kazein pepton, 3 g soya peptonu, 5 g sodyum klorit, 2.5 g dipotasyum hidrojen fosfat ve 80 g glukoz 1000 ml distile su içinde çözülüp tüplere 5'er ml dağıtıldı. SDA'daki maya kolonilerinden birer öze dolusu alınarak Falkon tüplerdeki Sabouraud sıvı besiyeri ve triptik soy broth içerisine inoküle edildi. Tüpler 35ºC'de 48 saat inkübe edildikten sonra sıvı besiyeri tüplerden uzaklaştırıldı ve tüplerin kenarları %0.25'lik safranin ile boyandı. Ayrıca GSSB ve GTSB içeren tüpler hazırlandı; maya inokülasyonu yapılmayan bu tüpler negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüp duvarında herhangi bir slime tabakası olmaması veya tüpte yalnızca hava-sıvı seviyesinin olduğu yerde halka şeklinde boya tutulumu olması negatif olarak değerlendirildi. Tüpün çeperlerindeki slime oluşumu var ya da yok şeklinde çıplak göz ile belirlendi.

Bütün deneyler iki kez gerçekleştirildi ve iki gözlemci tarafından ayrı ayrı değerlendirildi.

İstatistiksel analiz: Kan kültürlerinden ve diğer klinik örneklerden izole dilen suşların proteinaz, fosfolipaz aktiviteleri ve slime üretimleri arasındaki fark ki-kare (χ^2) testi ile değerlendirildi, $p<0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Proteinaz. Kan izolatlarının 12'si (++), 3'ü (+); idrar izolatlarının 5'i (++), 1'i (+); 2 yara izolatı (++); idrar sondası izolatı (++), yanık izolatı (++), ağız içi lezyon izolatı (++), kulak izolatı (++) ve tırnak izolatı (+) proteinaz aktivitesi belirlendi. Resim 1'de çalışma izolatlarımızın süt tozu agaroz üzerindeki Sap aktivitesi zonları görülmektedir. Çalışmamızda, Sap aktivitesi açısından kan izolatları ile diğer klinik izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Sap aktivitesi için p=1.00, χ^2 test, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.).

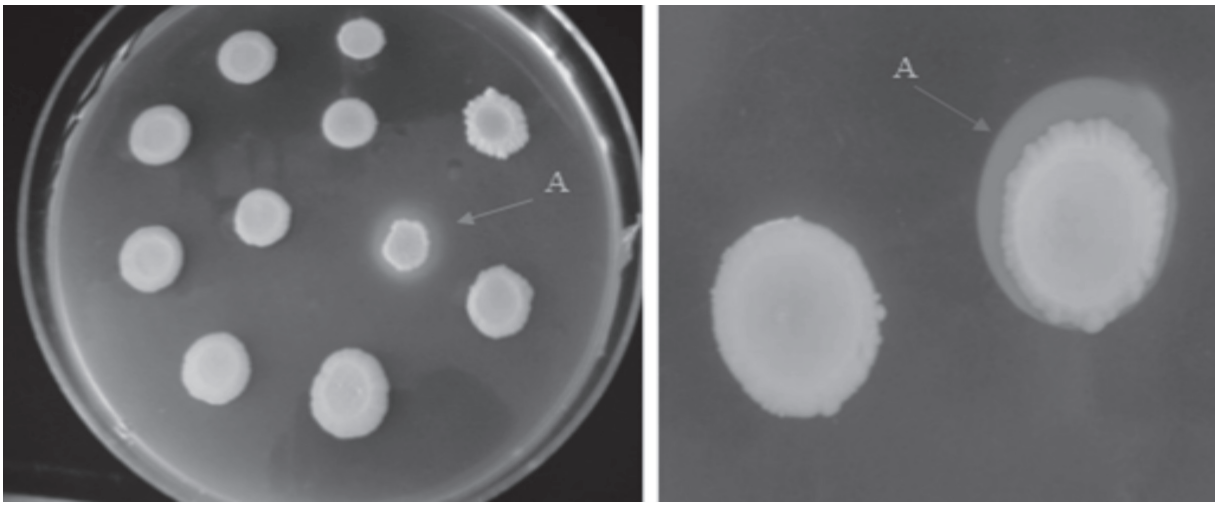


Resim 1. Süt tozu agaroz üzerinde Sap aktivitesi zonları.
D3: +, B3: ++ görünümü temsil eder. C3: C. albicans CBS 2730 (+++), C4: negatif kontrol (BSA sıvı besiyeri)

Sap aktivitesi (+) bulunanlar klinik izolatlar, kan (n:3), idrar (n:1) ve tırnak (n:1) izolatlarıydı.

Fosfolipaz. Çalışma izolatlarımızın (n:28) hiçbirinde fosfolipaz aktivitesini gösteren presipitasyon zonu (opak zon) görülmedi. Resim 2'de yumurta sarılı agarda, pozitif kontrol suşunun kolonisi etrafında oluşturduğu presipitasyon zonu (Pz:0.79) ve fosfolipaz negatif çalışma suşlarının kolonileri görülmektedir.

Slime üretimi. GSSB ve GTSB ile yapılan tüp tutunma deneylerinde kan ve diğer klinik izolatların slime üretimi sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Toplam 23 suşta her iki besiyeriyle de slime oluşumu görüldü. Yalnızca bir kan izolatı iki besiyeri ile de slime negatif bulundu. Diğer dört suşta ise iki besiyeriyle farklı sonuçlar elde edildi. Üç suş GSSB ile slime üretimi pozitif, GTSB ile negatif bulunurken; 1 suş GTSB ile slime üretimi pozitif, GSSB ile negatif bulundu. Slime pozitif ve negatif suşların tüp görünümleri Resim 3'te görülmektedir. Çalışmamızda, kan izolatları ile diğer klinik izolatların slime üretimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. (GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde p=0.484, GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde p=1.00, χ^2 test, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).



Resim 2. Yumurta sarılı agarda pozitif kontrol suşunun (A) koloni etrafında oluşturduğu presipitasyon zonu (Pz: 0.79) ve fosfolipaz negatif çalışma suşlarının koloni görünümleri.

Tablo 1. *Candida* parapsilosis suşlarının GSSB ve GTSB ile slime üretimi sonuçları.

		Kan		Kan dışı örnekler		Toplam	
		Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	Negatif n (%)
Besiyeri	GSSB	13 (86.7)	2 (13.3)	13 (100)	0 (0)	26 (92.8)	2 (7.2)
	GTBS	12 (80)	3 (20)	10 (76.9)	3 (23.1)	22 (78.5)	6 (21.5)

GSSB: Glukozlu sıvı sabouraud besiyeri, GTSB: Glukozlu triptik soy broth besiyeri

Resim 3. Slime üretimi pozitif (sol) ve negatif (sağ) suşların tüp görünümleri.

TARTIŞMA

Candida enfeksiyonlarının patogenezinde virülans faktörlerinin önemi büyüktür. Hücre dışı Sap ve fosfolipaz hidrolitik enzimlerinin bu virülans faktörlerinden olduğu gösterilmiştir[5]. *Candida*'larda asit proteinaz varlığı ilk defa 1965 yılında Staib tarafından saptanmış ve 3 yıl sonra Remold ve Fasold proteinaz enzimini saflaştırarak özelliklerini belirlemişlerdir[6,15]. Fosfolipaz aktivitesi ilk kez 1968 yılında Costa ve ark.[7] tarafından gösterilmiş ve fosfolipaz B 1995 yılında saflaştırılmıştır. Bu hidrolitik enzimler konak dokuya invazyon yoluyla patojenitede etkili olurlar[5]. Slime faktör üretimi özellikle koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonlarında ayrıntılı biçimde incelenmiş ve mikroorganizmanın virülansını artırdığı saptanmıştır[16]. Slime üretimi *Candida*'lar için de patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir. Slime faktör varlığında *Candida*'ların konak hücresine, protez ve kateter yüzeylerine tutunup daha kolay kolonizasyon ve enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir. Araştırmacılar *C. parapsilosis* fungemilerinin artışını, bu organizmanın slime oluşturma yeteneği ile açıklamaktadırlar[8].

Dağdeviren ve ark.[17], toplam 33 *C. parapsilosis* suşu ile BSA agar yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmalarında, *C. parapsilosis* suşlarının 14'ünün (%42.42) asit proteinaz ürettiğini ve bu izolatların 11'inin (%79) güçlü (++), 3'ünün (%21) orta düzey (+) Sap aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. On dokuz kan izolatının 5'i (%26.31) ve diğer klinik izolatların 9'u (%64.29) proteolitik aktivite göstermiştir. Bu iki grup arasında fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Kan dışı klinik izolatların tümü asit proteinaz aktivitesine sahip iken, bu gruptaki 5 idrar izolatı en yüksek düzey (++) Sap aktivitesi göstermiştir. França ve ark.'nın[18] çalışmasında, 34 *C. parapsilosis* izolatının 31'i (%91.2) proteaz aktivitesi göstermiştir. Bu izolatların %38.2'si güçlü proteinaz aktivitesine (+++) sahiptir. Kan kültüründen izole edilen 7 *C. parapsilosis* suşunun tamamının diğer klinik örneklerden (trakeal sekresyon, cilt ve tırnak) izole edilen suşlardan düşük olmakla birlikte, proteinaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. *C. parapsilosis*'in hem vulvovajinal hem de deri izolatlarının kan izolatlarına göre daha yüksek in vitro sap aktivitesi sergilemesi bakımından Sap üretimi ve izolasyon yeri arasında ilişki belirlenmiştir. Bu nedenle,

Saps, lokalize invaziv hastalara (özellikle vajinal enfeksiyonlarda) kıyasla kan dolaşımı enfeksiyonlarının patogenezi için daha az önemli görünmektedir[2]. İlginç bir veri olarak, Brezilya, Sao Paulo'da kandidürili hastalardan izole edilen *C. parapsilosis* suşlarının (n=4) hepsi proteolitik aktivite sergilemiştir[19]. Mohan ve Ballal'ın[20] çalışmalarında da, kan kültürlerinden izole edilen 5 *C. parapsilosis* izolatının tümünde proteinaz aktivitesi belirlenmiştir. Gürcan ve ark.[21] kan kültürlerinden izole edilen farklı *Candida* türlerinde yaptıkları çalışmada, 33 *C. parapsilosis* suşunun hiçbirinin fosfolipaz aktivitesi göstermediğini belirlerken, BSA içeren katı besiyeri kullandıkları deneylerinde suşların %85'inde proteolitik aktivite belirlemişlerdir. Çalışmamızda, hem kan hem de kan dışı klinik izolatların tümünde Sap aktivitesi saptanırken hiçbir izolatta fosfolipaz aktivitesi belirlenememiştir. Hem asit proteinaz hem de fosfolipaz aktivitesi açısından kan izolatları ile diğer izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Sap aktivitesi için p=1.00, χ^2 test). Çalışmamızda yalnızca bir hastanın hem kan hem idrar sondası izolatı bulunmaktadır, diğer tüm izolatlar farklı hastalardan izole edilmiştir. Bu hastanın aynı tarihte laboratuvara gönderilen kan izolatında (+), idrar sondası izolatında (++) Sap aktivitesi belirlenirken, slime üretimi iki farklı besiyerinin ikisinde de pozitif bulunmuştur. Literatürdeki tutarsız sonuçlar, çalışmalarda inokülum miktarı, inkübasyon süresi, substrat ve özellikle zon çapına atfedilen pozitiflik derecesinin farklılık göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca literatürdeki *C. parapsilosis* kompleks Sap aktivitesi çalışmaları genellikle az sayıda suşla yapılmıştır ve kan dışı klinik örnek tipleri değişkenlik göstermektedir. Suş sayısının artırıldığı çalışmalar, bu türün Sap aktivitesini daha iyi açıklayacaktır.

Çalışmamızda suşların fosfolipaz aktivitesini ölçmek için yumurta sarılı besiyeri kullanılmıştır. Yumurta sarılı agara fosfolipit kaynağı olarak yumurta sarısı eklenmiştir. Yumurta sarılı besiyeri esasen fosfalipaz B aktivitesini ortaya çıkarmaktadır. İbrahim ve ark.[22] yaptıkları bir çalışmada, hangi tip fosfolipazın tüm aktiviteye katkı sağladığını değerlendirmişler ve izolatların fosfolipaz B aktivitesi ile toplam hücre dışı fosfalipaz aktivitelerinin iyi korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi yönünden büyük değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Uzun bir dönem *Candida* türleri arasında, fosfolipaz üretiminin *C. albicans*'a özgü olduğu gibi bir izlenim edinilmiştir. Samaranayake ve ark.[12], 41 *Candida* izolatının fosfolipaz üretimini yumurta sarılı agar yöntemi ile taramış ve test edilen *C. albicans* suşlarının %79'unun hücre dışı fosfalipaz ürettiğini, *C. parapsilosis, C. glabrata* ve *C. tropicalis* suşlarının ise bu aktiviteyi göstermediğini saptamışlardır. Shimizu[23] ve Kantarcıoğlu[24], yumurta sarılı besiyeri kullanarak yaptıkları çalışmalarında, *C. parapsilosis* suşlarında fosfolipaz aktivitesi saptamadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda da, *C. parapsilosis* kompleks suşlarında fosfolipaz aktivitesi saptanmamıştır. Buna karşın, Barrett-Bee ve ark.[25] ise, RIA yöntemiyle *C. parapilosis* suşlarının düşük oranda fosfalipaz aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Ghannoum ve ark.[7], 51 izolatın test edildiği çalışmalarında, hem yumurta sarılı besiyeri hem de kolorimetrik yöntemler kullanılarak albicans dışı *Candida* türlerinin de hücre dışı fosfalipaz ürettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, *C. glabrata* suşlarının %41'inin, *C. parapsilosis* suşlarının %51'inin, *C. tropicalis* suşlarının %70'inin, *C. lusitaniae* suşlarının %80'inin ve *C. krusei* suşlarının %100'ünün saptanabilir düzeyde fosfalipaz ürettikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte araştırıcılar, albicans dışı *Candida* türlerinde saptanan fosfolipaz aktivitesinin *C. albicans*'a göre daha düşük düzeyde olduğunu vurgulamışlardır. *C. parapsilosis* patogenezinde fosfolipazların rolü daha az açıklana-

bilmiştir. Bazı araştırmacılar, *C. parapsilosis* suşlarının %51'inde fosfolipaz aktivitesi bildirirken ve bazıları fosfolipaz aktivitesi belirlememişlerdir[2]. Ayrıca, bazı araştırmacılar sistemik ve yüzeysel izolatları karşılaştırırken yalnızca kan dolaşımı izolatlarında fosfolipaz aktivitesini tanımlarken[17], diğerleri yüzeysel *C. parapsilosis* izolatlarında sistemik izolatlardan çok daha yüksek aktiviteler açıklamaktadır[26]. Brezilya'nın Sao Paulo kentinde kandidüri'ye neden olan dört *C. parapsilosis* suşundan yalnızca bir tanesi fosfolipaz aktivitesi sergilemiştir[19]. Dolayısıyla bu aktivite bulguları çelişkilidir. Verilerdeki bu tür tutarsızlıklar, test edilen suşlar arasındaki biyolojik farklılıkların yanı sıra düşük suş sayılarının sonucu olabilir.

İlk defa 1982'de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanan slime faktör; protein, hekzoaminler, nötral şekerler, fosforlu bileşikler gibi birçok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır[13]. *Candida*'larda yapılan slime aktivitesi çalışmaları daha çok *C. parapsilosis* üzerine yoğunlaşmıştır. Farklı *C. parapsilosis* izolatlarının çeşitli dokularda hastalığa neden olma kapasiteleri, slime oluşturma yeteneklerinden etkilenebilir. Brancini ve ark.[9], kan ve kataterden izole edilen 30 *C. parapsilosis* izolatının 24'ünde (%80) slime üretimi belirlemişlerdir. İzolatların çoğu (%67) orta (2+, 3+ pozitif) ya da güçlü (4+) slime üretimi gösterirken, dört izolat (%13) zayıf (1+) pozitif bulunmuştur. Altı izolatta ise (%20) slime üretimi belirlenmemiştir. Bu çalışmada, slime testinin yinelenebilirliği >%95 olarak bildirilmiştir. Özkan ve ark.[27], kan kültürlerinden izole edilen 19 *C. parapsilosis* suşunun tüp tutunma yöntemi ile %89.4'ünün slime pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Kandan izole edilen *Candida* suşlarında slime aktivitesinin araştırıldığı başka bir çalışmada tüp tutunma yöntemi kullanılarak 4 *C. parapsilosis* suşunun 2'si slime pozitif bulunmuştur[28]. Yücesoy ve Karaman[29], tüp tutunma deneyi ile slime pozitifliğini 12 *C. parapsilosis* izolatında %17 olarak belirlemişlerdir. Pfaller ve ark.[30] 60 *C. parapsilosis* izolatının 39'unda (%65) slime üretimi belirlemişlerdir. İzolatların 22'si (%37) orta veya güçlü slime pozitif, 17'si (%28) zayıf slime pozitifken; 21 izolat (%35) slime üretimi negatif belirlenmiştir. Testin yinelenebilirliğini %l00 olarak bildirillmiştir. Bu çalışmada, kan ve katater izolatlarının slime üretme yeteneği diğer izolatlarınkinden yüksek bulunmuştur. Aynı yöntemle yapılan başka bir çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen 35 *C. parapsilosis* suşunun %86'sı slime pozitif bulunurken, diğer örneklerden izole edilen 17 *C. parapsilosis* suşunun %47'si slime pozitif bulunmuş, kan izolatları ile diğer izolatların slime üretimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir[31]. İkinci bir çalışmada kan dolaşımı izolatlarının %59'unun ve deri izolatlarının %39'unun slime ürettiği belirlenmiştir[32]. Buna karşın, başka bir araştırma, kan izolatlarının yalnızca %21.8'inin slime oluşturabilecek özellikte olduğunu bulmuştur[33]. Sonuçlardaki farklılık, slime üretimini değerlendirmek için kullanılan koşullara ve çalışmadan önce suşun depolanma uzunluğuna ve yöntemine bağlı olabilir. Slime üretimi *C. parapsilosis* suşlarında yüksek oranlarda saptanmıştır. Çalışmamızda, GSSB kullandığımız tüp tutunma deneyinde tüm izolatların %92.8'inde, GTSB kullandığımız tüp tutunma deneyinde ise tüm izolatların %78.5'inde slime oluşumu görülmüştür. Çalışmamızda, GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde, kan izolatlarının %86.7'si pozitif, diğer izolatların ise %100'ü pozitif belirlenmiştir. GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde, kan izolatlarının %80'i pozitif, diğer izolatların ise %76.9'u slime pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda, kan izolatları ile diğer izolatların slime oluşturma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $p=0.484$, GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $p=1.00$, χ^2 test, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.). Ancak dört suşta iki besiyeri ile farklı sonuçlar elde edil-

miştir. Üç suş GSSB ile slime üretimi pozitif, GTSB ile negatif bulunurken, 1 suş GTSB ile slime üretimi pozitif, GSSB ile negatif bulunmuştur. Slime üretiminin tesbitinde GSSB'nin daha iyi bir tercih olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, *Candida* parapsilosis kompleks izolatlarında Sap aktivitesi ve slime üretimi virülans faktörü olarak öne çıkmaktadır. Çalışmamızda kan ve kan dışı klinik izolatlar, Sap aktivitesi ve slime üretimi bakımından farklılık göstermemiştir. Fosfolipaz aktivitesinin tesbiti için yumurta sarılı agarın hazırlanmasında değişiklikler yapılmasının yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, et al.** Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* 1991; 16:91(3B):S86-9.
2. **Trofa D, Gácser A, Nosanchuk JD.** *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:606-25. https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08
3. **Gültekin B, Eyigör M, Telli M, Aksoy M, Aydın N.** Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *Ankem Derg* 2010; 24:202-8.
4. **Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A.** Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Ankem Derg* 2015; 29:105-13.
5. **Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B.** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48:365-77. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x
6. **Naglik RJ, Challacombe SJ, Hube B.** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:400-28. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003
7. **Ghannoum MA.** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:122-43. https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.122-143.2000
8. **Weems JJ Jr.** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 1992; 14:756-66. https://doi.org/10.1093/clinids/14.3.756
9. **Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD.** Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:452-6.
10. **Růzicka F, Holá V, Votava M, Tejkalová R.** Detection and significance of biofilm formation in yeasts isolated from hemocultures. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:150-5.
11. **Banerjee A, Ganesan K, Datta A.** Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1991; 137:2455-61. https://doi.org/10.1099/00221287-137-10-2455
12. **Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW.** Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* 1984; 22:201-7. https://doi.org/10.1080/00362178485380331
13. **Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH.** Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. *Infect Immun* 1982; 37:318-26.
14. **Cevahir N, Demir M, Mete E, Kaleli İ.** *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretinin araştırılması. *Infeks Derg* 2003; 17:67-70.
15. **Staib F.** Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965; 4:187-93. https://doi.org/10.1080/00362176685190421
16. **O'Gara JP, Humphreys H.** *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001; 50:582-7. https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-582
17. **Dağdeviren M, Çerikçioğlu N, Karavuş M.** Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* on strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 2005; 48:321-6. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01145.x
18. **França EJG, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Favero D, Oliveira MT, Furlaneto MC.** Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses* 2011; 54:e44-51. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01825.x
19. **da Silva EH, Ruiz L da S, Matsumoto FE, et al.** Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999–2004): characteristics of the yeast isolates. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49:349-53. https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000600003
20. **Mohan das V, Ballal M.** Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25:208-10.
21. **Gürcan Ş, Alver A, Ercan İ, Ener B.** Çeşitli *Candida* türlerinde virülansın değerlendirilmesi: İn vitro ve in vivo çalışma. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30:1493-502. https://doi.org/10.5336/medsci.2009-16724
22. **İbrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al.** Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63:1993-8.
23. **Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS.** Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses* 1996; 39:161-7. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1996.tb00120.x
24. **Kantarcıoğlu AS.** Detection of phospholipase and proteinase production in clinical isolates of *Candida* species. 9th European Congress of Clinical Microbiology

and Infectious Diseases, Abstracts, Berlin, Almanya; 1999:340.

25. **Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryles JF.** A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 1995; 131:1217-21.
26. **Fernanado PH, Panagoda GJ, Samaranayake LP.** The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS* 1999; 107:1034-42. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01507.x
27. **Özkan S, Kaynak F, Kalkancı A, Abbasoğlu U, Kuştimur S.** Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:319-23. https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000300019
28. **Vinitha M, Ballal M.** Biofilm as virulence marker in *Candida* isolated from blood. *World J Med Sci* 2007; 2:46-8.
29. **Yücesoy M, Karaman M.** *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38:91-8.
30. **Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ.** Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21:9-14. https://doi.org/10.1016/0732-8893(94)00114-C
31. **Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al.** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1244-8. https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1244-1248.2002
32. **Růzicka F, Holá V, Votava M, Tejkalová R.** Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52:209-14. https://doi.org/10.1007/BF02931300
33. **Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, et al.** Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1843-50. https://doi.org/10.1128/JCM.00131-07

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):169-175, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.169

Araştırma

Trichosporon Türlerinin Tanımlanmasında Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Sisteminin API ID 32C ve VITEK 2 ile Karşılaştırılması[§]

Süleyman PELİT*, Gonca ERKÖSE GENÇ*, Ayşe BARIŞ, Zayre ERTURAN***

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

***Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul*

ÖZ

Amaç: *Trichosporon türleri doğada geniş dağılım gösterir; insanlarda ise deri ve mukozada kolonize olabilen mayalardır. Trichosporon türlerinin neden olduğu invaziv enfeksiyonlar yaygın olmamakla birlikte, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla fatal seyirlidir. Trichosporon türlerinin doğru identifikasyonu zor olmasına karşın uygun tedavi yaklaşımları açısından önemlidir. Fenotipik ve genotipik yöntemlere alternatif olarak Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) hızlı ve doğru bir identifikasyon yöntemi olarak gündeme gelmektedir. Bu araştırmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen Trichosporon cinsi mayaların MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlanması ve bu sonuçların rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların identifikasyonunda sıkça kullanılan API ID 32C (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) ve VITEK 2 (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) sistemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Yoğun bakım hastalarından izole edilen ve konvansiyonel yöntemlerle cins düzeyinde tanımlanan toplam 45 Trichosporon suşu, MALDI-TOF MS, API ID 32C kiti ve VITEK 2 otomatize sistemi ile tanımlanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.*

Bulgular: *Her üç sistem ile yapılan tanımlama tüm izolatlar için %100 uyumlu bulunmuştur. İzolatların 44 (%97.8)'ü T. asahii, biri (%2.2) ise T. mucoides olarak tanımlanmıştır.*

Sonuç: *Buna göre MALDI-TOF MS yöntemi invazif enfeksiyonlarda en sık rastlanan Trichosporon türü olan T. asahii'nin tanımlanmasında API ID 32C ve VITEK 2 ile aynı doğrulukta ancak daha hızlı ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir, ayrıca düşük maliyetli olması bir alternatif oluşturmaktadır.*

Anahtar kelimeler: *Trichosporon, identifikasyon, MALDİ TOF MS*

ABSTRACT

Comparision of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight (MALDI-TOF MS) with API ID 32C and VITEK 2 For the Identification of Trichosporon Species

Objective: *Trichosporon species have a widespread distribution in the nature and human skin and mucosa can be colonized with Trichosporon species. Invasive infections caused by Trichosporon species are uncommon but frequently fatal in immunosuppressive patients. Correct identification of Trichosporon species is challenging but important for appropriate treatment approches. As an alternative to phenotypic and genome-based identification techniques, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) is emerging as a rapid and accurate identification method. In this study we aimed to evaluate MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for the identification of Trichosporon species and compare it with frequently used API ID 32C (bioMérieux, Marcy I'Etoile, France) and VITEK 2 (bioMérieux, Marcy I'Etoile, France).*

Material and Methods: *A total of 45 Trichosporon strains that were isolated from intensive care unit patients and identified by conventional methods at the genus leve, were identified by MALDI TOF MS, API ID 32C and VITEK 2 and the results were compared.*

Results: *All systems yielded fully (100 %) concordant results for all of the isolates. Forty-four (97.8%) of the 45 isolates were identified as T. asahii and one (2.2%) as T. mucoides.*

Conclusion: *The MALDI TOF MS method was found to be an easily applicable alternative tool for identifying T. asahii strain of Trichosporon spp. with the comparable diagnostic accuracy as API ID 32 C, and VITEK 2 but with low costs, and faster yield.*

Keywords: *Trichosporon, identification, MALDI TOF MS*

Alındığı tarih: 24.04.2017
Kabul tarihi: 07.07.2017
Yazışma adresi: Süleyman Pelit, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Halaskargazi Cad. Etfal Sok. Şişli / İstanbul
Tel: (0212) 373 50 00
e-posta: s_pelit@hotmail.com

GİRİŞ

İnvazif mantar enfeksiyonları, hematolojik maligniteli ve derin nötropenik hastalar başta olmak üzere, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde morbidite ve mortalitenin önemli nedenleri arasındadır. Bu hastalarda görülen mantar enfeksiyonlarından sıklıkla *Candida* ve *Aspergillus* türleri sorumlu olsa da, günümüzde *Candida* cinsi mayalarla benzer klinik tablolara yol açan, fakat tedavi seçenekleri daha sınırlı olan ender görülen diğer maya mantarlarının insidansları dikkat çekici şekilde artmaktadır[1,2].

Trichosporon türleri doğada geniş bir dağılıma sahip olup, toprak, su ve bitkiler üzerinde bulunabilen ve insanlarda deriyi ve mukozaları kolonize edebilen mayalardır. Önceleri yüzeyel enfeksiyon etkeni olarak bilinen bu mikroorganizmalar, günümüzde invazif enfeksiyonlardan giderek artan sıklıkta izole edilmektedir. *Trichosporon* cinsi mayalarla meydana gelen sistemik enfeksiyonların neredeyse tümü *Trichosporon asahii, Trichosporon asteroides, Trichosporon cutaneum, Trichosporon inkin, Trichosporon mucoides* ve *Trichosporon ovoides* türleri ile oluşmaktadır[3].

Klinik örneklerden izole edilen *Trichosporon* cinsi mayaların identifikasyonunda zorluklar yaşanmakla birlikte, antifungal duyarlılık profili nedeniyle hastaların uygun tedaviye yönlendirilebilmeleri için bu mayaların doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanması önem taşımaktadır[4]. Bu mantarlar rutin klinik laboratuvarlarda konvansiyonel olarak makroskobik, mikroskobik ve bazı biyokimyasal özelliklerine göre cins düzeyinde tanımlanabilmektedir[3,5]. *Trichosporon* türlerinin identifikasyonunda API ID 32C (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa), API 20C AUX (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) ve RapID Yeast Plus (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, GA, ABD) gibi asimilasyon temelli hazır ticari kitler ile VITEK 2 (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) gibi otomatize sistemleri kullanılabilmekle birlikte, bu yöntemlerin veritabanlarında sınırlı sayıda *Trichosporon* türünün yer alması kısıtlayıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır[6]. Mayaların tanımlanmasında çeşitli moleküler yöntemler de kullanılabilmekle birlikte, bu yöntemler her rutin laboratuvar için ekonomik açıdan uygun değildir[4].

Son yıllardaki gelişmelerle çeşitli patojenlerin kütle spektrometre temelli tekniklerle tanımlanması, mikrobiyoloji laboratuvarında identifikasyonda kullanılabilecek yeni bir seçenek sunmaktadır. Mikroorganizmaların spesifik protein yapılarının iyonize olarak uçuş zamanına göre protein parmak izinin oluşturulması prensibine dayanan matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemi ile patojen mikroorganizmalar hızlı bir şekilde tanımlanabilmektedir. Bu yöntemde mikroorganizmaların protein parmak izleri, sistemin veritabanındaki referanslarla karşılaştırılmaktadır[4].

Günümüzde Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya), Saramis (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa), VITEK MS (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) ve Andromas (Andromas, Paris, Fransa) olmak üzere ticari olarak dört farklı sistem bulunmaktadır[7].

Bu araştırmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Trichosporon* cinsi mayaların MALDI-TOF MS yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanması ve bu sonuçların rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların identifikasyonunda sıkça kullanılan API ID 32C (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) ve VITEK 2 (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) sistemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Mayıs 2014-Haziran 2015 tarihleri

arasında, 26-95 yaş aralığındaki, yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören 45 hastanın klinik örneklerinden (43'ü idrar ve ikisi kan) izole edilen 45 maya suşu dâhil edilmiştir. İdrar örnekleri rutin prosedür olarak üriner sistem patojenlerinin izolasyonunda kullanılan kromojenik agara (RTA, Türkiye) ekilmiştir. Kan örnekleri ise BACTEC 9120 (Becton-Dickinson, Sparks, MD, ABD) otomatize kültür sisteminde inkübe edilerek, pozitif sinyal veren şişelerden Gram boyama yapılarak, %5 koyun kanlı agar (RTA, Türkiye), çikolata agara (RTA, Türkiye) ve Sabouraud dekstroz agara (SDA) (RTA, Türkiye) ekim yapılmıştır. Maya suşlarının konvansiyonel olarak tanımlanmasında %1 Tween 80 ilave edilmiş mısır unlu jelozda 25°C'de 72 saatte mikroskobik morfolojisi, üre agarda üreaz enzimi varlığı incelenmiştir. Üreaz testinde negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak *Proteus mirabilis* ATCC 12453 kullanılmıştır[5].

Suşlar, VITEK 2 YST Compact Otomatize Sistem maya tanımlama kartı (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) ve API ID 32C maya tanımlama kiti (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa) ile üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılarak tanımlama yapılmıştır[6].

MALDI-TOF MS Sistemi: Bu işlem için tüm izolatların SDA'daki 24 saatlik taze pasajları kullanılmıştır. Mayalardan protein ekstraksiyonu işlemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda etanol formik asit yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrası oluşan süpernatant kısmından 1 µl alınarak MALDI plağı üzerindeki iki ayrı noktaya konulmuştur. Bu noktalardaki sıvı kuruduktan hemen sonra örneğe 1 µl matriks solüsyonu (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) ilave edilmiş ve yine kuruması beklenmiştir. Ardından plak MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazına konularak Flex Analysis bilgisayar programı ile kütle spektrometreleri elde edilmiştir. Elde edilen protein profilleri Bruker BioTyper v3.1 (Bruker Daltonics, Almanya) yazılımı ve rutin veri tabanı kullanılarak incelenmiş ve maya suşları tanımlanmıştır. Elde edilen skor değerleri 2,0'ın üzerinde ise sonuç tür düzeyinde anlamlı ve 1,7-2,0 arasında ise cins düzeyinde güvenilir olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin 1,7'nin altında olması ise güvenilir olmayan identifikasyon olarak kabul edilmiştir[6].

BULGULAR

Çalışmada incelenen 45 maya izolatının tümünün SDA'da 37°C'de 24-48 saatte ürediği, %1 Tween 80 ilaveli mısır unlu jelozda hif, blastospor ve artrospor oluşturduğu ve hepsinin üreaz testinin pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre tüm suşlar *Trichosporon* cinsi olarak tanımlanmıştır.

Mayaların tanımlanmasında kullanılan VITEK 2, API ID 32C ve MALDI-TOF MS sistemlerinin her üçü ile %100 uyumlu olarak suşların 44 (%97.8)'ü *T. asahii*, 1'i (%2.2) ise *T. mucoides* olarak tanımlanmıştır. VITEK 2 ve API ID 32C ile elde edilen identifikasyon sonuçlarının geçerlilik değeri %99'un üzerinde olmuştur. Bruker MALDI-TOF MS ile tanımlanan tüm mikroorganizmaların skor değerleri 2.0'ın üzerinde olarak saptandığından, bu sonuçlar tür düzeyinde anlamlı olarak kabul edilmiştir. İdentifikasyon API ID 32C ile 48 saatte, VITEK 2 ile 24 saatte ve MALDI-TOF MS ile 25-30 dakikada gerçekleştirilmiştir.

TARTIŞMA

Trichosporon cinsi mayalar günümüzde yaşamı tehdit eden fırsatçı patojenler olarak karşımıza çıkmakta, özellikle hematolojik maligniteli ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda sıklığı giderek artan oranlarda invazif enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu cinse ait mayaların hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması hastaların uygun

tedaviye başlayabilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin efektif olarak uygulanabilmesi açısından oldukça önemlidir[8]. *Trichosporon* cinsi mayaların tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntemler zaman alıcıdır ve tür düzeyinde identifikasyon için yetersizdir. Bu mayalar moleküler yöntemler ile tür düzeyinde güvenilir bir şekilde tanımlanabilmekle birlikte, pahalı, zaman alıcı deneyim gerektirmelerinden dolayı her laboratuvarda uygulanamamaktadır. Bu nedenle çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarı mayaların tanımlanması için API ID 32C (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa), VITEK 2 (bioMérieux, Marcy I'Etoile, Fransa), Phoenix 100 (Becton-Dickinson, Sparks, MD, ABD) gibi hızlı ticari tanımlama sistemleri kullanmaktadır[4].

Guo ve ark.'nın[9] altı farklı *Trichosporon* türünden oluşan 45 klinik izolatı dâhil ettikleri çalışmalarında, moleküler yöntem referans alındığında VITEK 2 Compact YST sistemi ile 36 *T. asahii* izolatının %75'i doğru tanımlanırken, yedi suş tanımlanamamış ve iki suş da yanlış tanımlanmıştır. Veri tabanında bulunmayan türlerden oluşan dokuz izolatın beşi tanımlanamazken, iki suş *Cryptococcus laurentii*, iki suş da *T. asahii* olarak yanlış tanımlanmıştır.

Mayaların tanımlanmasında kullanılan API ID 32C, AuxaColor ve VITEK 2 ticari testlerinin değerlendirildiği bir metaanaliz çalışmasında, 26 literatür incelenmiş, sonuçlara göre VITEK 2 sistemi ile 61 *T. asahii* suşunun %85'inin, 21 *T. mucoides* suşunun tamamının; API ID 32C sistemi ile ise 11 *Trichosporon beigelii* suşunun %90'ının doğru tanımlandığı belirtilmiştir[10].

Son dönemlerde MALDI-TOF MS, rutin mikrobiyoloji laboratuvarında mikroorganizmaların tanımlanmasında güvenilir sonuç vermesi, hızlı ve kolay uygulanması ve maliyetinin düşük olması nedeniyle umut veren bir sistem olarak ortaya çıkmıştır[7].

Chao ve ark.[1] sekizi *Trichosporon* cinsi içinde bulunan toplam 200 maya suşunun tanımlanmasında iki MALDI-TOF MS sisteminin (Bruker Biotyper ve VITEK MS) sonuçlarını DNA sekans analizi, Phoenix 100 ve VITEK 2 sistemlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmışlardır. *Trichosporon* cinsinde yer alan altı *T. asahii*, bir *T. mucoides* ve bir *Trichosporon insectorum*'dan oluşan sekiz suşun MALDI-TOF MS sistemleri ile tanımlanmasında, Bruker Biotyper ile altısı (%75), VITEK MS ile beşi (%62.5) doğru olarak tanımlanmıştır. Bruker Biotyper sistemi *T. asahii* suşlarından birini tanımlayamamış, *T. insectorum* suşunu ise *C. albicans* olarak tanımlamıştır. VITEK MS ise *T. asahii* suşlarından birini *T. asteroides* olarak, *T. mucoides* suşunu ise *Geotrichum klebahnii* olarak tanımlamıştır.

Durán-Valle ve ark.[11] üçü *T. mucoides* olan 175 maya suşunun taımlanmasında VITEK MS ile API ID 32C'yi karşılaştırdıkları çalışmalarında, VITEK MS'in API ID 32C'den daha güvenilir olduğu ve yalnızca birkaç dakika içerisinde sonuç alınabildiğini belirtmişlerdir. Her üç *T. mucoides* suşu VITEK MS ile doğru olarak tanımlanmıştır.

Dhiman ve ark.[2] üçer *T. asahii* ve *T. mucoides* suşu dâhil olmak üzere toplam 261 maya suşunu inceledikleri çalışmalarında, *Trichosporon* türlerinin tamamını Bruker MALDI-TOF MS sistemi ile doğru olarak tanımlamışlardır.

Almeida Junior ve ark.[12] 16'sı *Trichosporon* türü ve 71'i *T. asahii* olan toplam 93 maya suşunu Bruker Biotyper sistemi ile tanımlamış, sonuçları IGS1 (intergenic spacer 1) geni sekans analizi verileri ile karşılaştırmışlardır. Bruker Biotyper 3.0 veritabanı ile suşların cins düzeyinde %85.1'ini ve tür düzeyinde ise yalnızca %31.3'ünü doğru olarak tanımlamışlardır. *Trichosporon dermatis* suşlarının tamamı, bu tür veritabanında bulunmadığı için *T. mucoides* olarak tanımlanırken, 21 adet *T. asahii* suşunun 11'i

(%52.4) *T. cutaneum* olarak identifiye edilmiştir. Araştırmacılar bu veritabanının geliştirilmeye gereksinimi olduğu sonucuna varmışlardır.

Trichosporon cinsi için en kapsamlı araştırmayı yapan Kolecka ve ark.[4] 14 farklı *Trichosporon* türüne ait toplam 45 kültür koleksiyonu suşunun 41'ini (%91.1) ve klinik örneklerden izole edilmiş, 10 farklı *Trichosporon* türüne ait toplam 102 suşun 101'ini (%99.0) Bruker MALDI-TOF MS sistemi ile doğru olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada, ilk olarak 2009 yılında tanımlanan bir tür olan *Trichosporon mycotoxinivorans*'ın da doğru olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, yazarlar, birbirine çok yakın türler olan *T. inkin/T. ovoides, Trichosporon japonicum/T. asteroides* ve *T. dermatis/T. mucoides*'in doğru tanımlanamadığını vurgulamışlardır.

Bu çalışmada ise, MALDI-TOF MS sistemi olan Bruker Biotyper ile 45 suşun 44'ü (%97.8) *T. asahii*, biri (%2.2) ise *T. mucoides* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçların, API ID 32C ve VITEK 2 ile elde edilen sonuçlarla %100 uyumlu olduğu görülmüştür.

Mayaların MALDI-TOF MS ile identifikasyonu öncesinde yaklaşık 25 dakika süren bir ekstraksiyon aşaması gerçekleştirilmesi gerekli olmakla birlikte, bazı araştırmacılar buna alternatif olan ve daha kısa süren yöntemler geliştirdiklerini bildirmişlerdir[13-19].

Trichosporon asahii Türkiye dâhil birçok ülkede en sık izole edilen *Trichosporon* türüdür[20-23]. Bu türün birçok antifungale karşı yüksek MİK değerlerine sahip olması özellikle daha sık izole edildiği immunsupresif ve yenidoğan hasta grubunda sorun oluşturmaktadır[20]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, bu türün amfoterisin B, flukonazol ve 5-flusitozine düşük duyarlı olduğu ve vorikonazolün en aktif antifungal olduğu belirtilmiştir[23]. Mantar tedavisinde sıklıkla kullanılan bu antifungallere karşı duyarlılığının düşük olması, bu türün hızlı ve doğru olarak tanımlanmasının tedaviyi yönlendirmede önem taşıdığını göstermektedir[21-23].

MALDI-TOF MS, laboratuvarlarda kullanılan API ID 32C ve VITEK 2'ye göre daha hızlı, aynı gün içinde sonuç alınabilen bir sistemdir. Cihaz ve bilgisayar yazılımı için başlangıçta yüksek bir fiyat ödense de, sarf malzeme ve reaktif gereksinimi ihmal edilebilecek düzeydedir. Ayrıca aynı cihazla Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, *Nocardia* ve *Actinomycetes* spp. ve mikobakteriler gibi birçok mikroorganizma tanımlanabilmektedir[2,13,24].

Bu çalışmanın bazı eksik yönleri bulunmaktadır. Çalışmamızda, bir tek *T. mucoides* suşunun haricinde *T. asahii* dışındaki türler yer almadığından, diğer *Trichosporon* türlerinde MALDI-TOF MS ile diğer iki sistemin uyumu değerlendirilememiştir. Yine, incelenen 45 suşun kullanılan yöntemlerle elde edilen tür tanımları moleküler yöntemlerle doğrulanamamıştır. Bu çalışma izolat sayısı yönünden yurdumuzda ve dünyada yapılmış olan az sayıdaki çalışmadan biridir.

Sonuç olarak, MALDI-TOF MS yöntemi *T. asahii*'nin tanımlanmasında VITEK 2 ve API ID 32C ile %100 oranında uyumlu olan, hızlı sonuç alınan, düşük maliyetli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer türlerin bu konuda değerlendirilebilmesi için ek çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. **Chao QT, Lee TF, Teng SH, et al.** Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PLoS One* 2014; 9:e109376. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109376
2. **Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL.** Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of

yeast. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1614-6. https://doi.org/10.1128/JCM.02381-10

3. **Howell SA, Hazen KC.** *Candida, Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW eds. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington DC: ASM Press, 2011:1793-1821. https://doi.org/10.1128/9781555816728.ch115
4. **Kolecka A, Khayhan K, Groenewald M, et al.** Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2491-500. https://doi.org/10.1128/JCM.00470-13
5. **Larone DH.** Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 5th ed. Washington DC: ASM Press, 2011.
6. **Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM.** Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24:682-700. https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11
7. **Mancini N, De Carolis E, Infurnari L, et al.** Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2453-7. https://doi.org/10.1128/JCM.00841-13
8. **Marklein G, Josten M, Klanke U, et al.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2912-7. https://doi.org/10.1128/JCM.00389-09
9. **Guo LN, Xiao M, Kong F, et al.** Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3805-11. https://doi.org/10.1128/JCM.00937-11
10. **Posteraro B, Efremov L, Leoncini E, et al.** Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A meta-analysis of their accuracy. *J Clin Microbiol* 2015; 53:2439-50. https://doi.org/10.1128/JCM.00802-15
11. **Durán-Valle MT, Sanz-Rodríguez N, Mu-oz-Paraíso C, Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL.** Identification of clinical yeasts by VITEK MS system compared with API ID 32C. *Med Mycol* 2014; 52:342-9. https://doi.org/10.1093/mmy/myt036
12. **de Almeida Júnior JN, Figueiredo DSY, Toubas D, et al.** Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:784-90. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12502
13. **Buchan BW, Ledeboer NA.** Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1359-66. https://doi.org/10.1128/JCM.03105-12
14. **Cheng JWS, Tang YE, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP.** Modified protocol for yeast identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Am J Microbiol Res* 2013; 4:71-3. https://doi.org/10.12691/ajmr-1-4-2
15. **Cassagne C, Cella AL, Suchon P, Normand AC, Ranque S, Piarroux R.** Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol* 2013; 51:371-7. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.720720
16. **Pinto A, Halliday C, Zahra M, et al.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* 2011; 6:e25712. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025712
17. **Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Gräser Y, Elsner P, Hipler UC.** Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses* 2012; 55:276-80. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02086.x
18. **Theel ES, Schmitt BH, Hall L, et al.** Formic acid-based direct, on-plate testing of yeasts and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3093-5. https://doi.org/10.1128/JCM.01045-12
19. **Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, et al.** Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:841-8. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1383-y
20. **De Almeida Júnior JN, Hennequin C.** Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. *Front Microbiol* 2016;7:1629. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01629
21. **Wolf DG, Falk R, Hacham M, et al.** Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4420-5. https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4420-4425.2001
22. **Hazirolan G, Canton E, Sahin S, Arikan-Akdagli S.** Head-to-head Comparison of inhibitory and fungicidal

activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:4841-7.
https://doi.org/10.1128/AAC.00850-13

23. **Kalkancı A, Sugita T, Arikan S, et al.** Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. *Med Mycol* 2010; 48:141-6.
https://doi.org/10.3109/13693780902977984
24. **Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR.** Evaluation of matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3482-6.
https://doi.org/10.1128/JCM.00687-09

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):176-184, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.176

Araştırma

Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Direnç Sağlayan Gen Mutasyonlarının ve Direnç Genlerinin Araştırılması

Oya PAZARLI*, Füsun CÖMERT*, Canan KÜLAH*, Elif AKTAŞ*, Füruzan KÖKTÜRK**

**Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak*

***Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Zonguldak*

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, bölgemizdeki Escherichia coli ve Klebsiella spp. izolatlarında kinolon direnç sıklığının belirlenmesi, bu izolatlarda sık görülen kinolon direnç mekanizmalarının varlığının araştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Şubat-Ağustos 2009 tarihleri arasında izole edilen nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı bulunan 265 Escherichia coli, 33 Klebsiella pneumoniae ve 2 Klebsiella oxytoca izolatında qnrA, qnrB, qnrS, aac(6')-Ib, gyrA ve parC gen bölgelerinin araştırılması polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle yapılmıştır. gyrA ve parC gen bölgelerindeki mutasyonların saptanması için dizi analizi yapılmıştır.*

Bulgular: *Nalidiksik asit direnci E. coli için % 52, Klebsiella spp. için % 27.5 olarak belirlenmiştir. Nalidiksik aside dirençli izolatlarda beta-laktam, aminoglikozit, trimetoprim-sülfometoksazole direncinin ve GSBL üretiminin anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. gyrA için kinolon direncini tanımlayan bölgede (Ala67-Gln106) çift mutasyon olduğu, bunların Ser83Leu ve bir izolat dışında Asp87Asn, tek izolatta ise Asp87Tyr şeklinde olduğu belirlenmiştir. parC için dizileme yapılan izolatların hepsinde Ser80Ile değişimi olduğu gözlenmiş, izolatların 32'sinde (% 40,3) ilave bir mutasyon bulunduğu ve bunların 26 izolatta Glu84Val, 4 izolatta Glu84Gly, 2 izolatta ise Glu84Ala olduğu belirlenmiştir. E. coli izolatlarının 99'unda (% 37,4), K. pneumoniae izolatlarının dördünde (% 12,1) aac(6')-Ib geni belirlenmiştir. İncelenen izolatlarda qnr geni bulunmamıştır.*

Sonuç: *İzolatlarımızda kinolon direnci ve GSBL üretimi yüksek bulunmuştur. Kinolon dirençli izolatlarımızda gyrA ve parC bölgelerinde üç ve daha fazla mutasyonun bulunduğu ilave olarak aac(6')-Ib'nin belirgin olarak direnç mekanizmasına eşlik ettiği belirlenmiştir. İzolatlarımızda qnr belirlenmemiştir.*

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli, Klebsiella spp., kinolon direnci, qnrA, qnrB, qnrS, aac(6')-Ib, gyrA mutasyonu, parC mutasyonu*

ABSTRACT

The Evaluation of Resistance Genes and Gene Mutations in Quinolone Resistant Escherichia coli and Klebsiella spp. Isolates

Objective: *The aims of this study are to detect the quinolone resistance rates among Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae spp. isolates in our region and to investigate the most common quinolone resistance mechanisms.*

Material and Methods: *The presence of qnrA, qnrB, qnrS, aac(6')-Ib, gyrA and parC genes were investigated by polymerase chain reaction method in 265 Escherichia coli, 33 Klebsiella pneumoniae and two Klebsiella oxytoca strains which were isolated between February–August 2009, and found to be non/intermediate susceptible to nalidixic acid . Sequence analysis was used for detection of gyrA and parC mutations.*

Results: *Resistance to nalidixic acid was determined as 52% for E. coli and 27.5% for Klebsiella spp. Beta-lactam, aminoglycoside, trimethoprim-sulfamethoxazole resistance and ESBL-production rates were significantly higher among nalidixic acid resistant isolates. Double mutations were detected in gyrA quinolone resistance defining region (Ala67-Gln106); the first one being Ser83Leu in all isolates and the other being Asp87Tyr in one isolate and Asp87Asn in other isolates. Ser80Ile alteration was observed among all isolates sequenced for parC mutations; while 32 (40.3%) of the isolates had an additional mutation, as Glu84Val, Glu84Gly and Glu84Ala in 26, four and two, respectively. The aac(6')-Ib gene was detected in 99 (37.4%) of E. coli and four (12.1%) of K. pneumoniae isolates. The qnr gene was not detected in any of the tested isolates.*

Conclusion: *The quinolone resistance rates and accompanying ESBL-production was high among the isolates in our region. We have detected three or more mutations in gyrA and parC regions in quinolone resistant isolates, and additional aac(6')-Ib gene in a significant number of isolates. The qnr gene was not detected in any of the tested isolates.*

Keywords: *Escherichia coli and Klebsiella spp., quinolone resistance, qnrA, qnrB, qnrS, aac(6')-Ib, gyrA mutation, parC mutation*

Alındığı tarih: 13.12.2016
Kabul tarihi: 08.07.2017
Yazışma adresi: Füsun Cömert, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kozlu / Zonguldak
Tel: (0372) 261 24 32
e-posta: fusbeg@yahoo.com

GİRİŞ

Kinolon grubu antibiyotiklere yaygın olarak kullanılmaları nedeniyle hastane kaynaklı izolatların yanı sıra toplum kaynaklı izolatlarda da direnç oranlarında belirgin artış gözlenmekte, ülkemiz için ampirik tedavide güvenilirliklerini yitirmek üzere oldukları bildirilmektedir[1]. Kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç doğal ve kazanılmış olabilmektedir. Doğal direnç endojen "çoklu ilaç atım pompalarının" üretimi ile tanımlanmıştır. Kazanılmış direnç ilacın hedefi olan bakteri enzimlerinde (DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV) kromozomal mutasyonlar, çoklu ilaç atım pompalarının aşırı üretimini aktive eden mutasyonlar, ilaca geçirgenlik azalması veya plazmid aktarımlı olarak gerçekleşmektedir[2]. Topoizomeraz II'yi kinolon inhibisyonundan koruyan Qnr, genel aminoglikozid asetiltransferaz enziminin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* ve kinolon pompa proteinleri olan *QepA* ve *OqxAB* plazmid aracılı dirençte rol oynadığı düşünülen proteinlerdir[3-5]. Kinolon direncinin aktarımında rol oynayan plazmidin aynı zamanda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), kloramfenikol asetiltransferaz ve bazı dezenfektan direnç genlerinin aktarımını da yaptığı bildirilmiştir[3].

Escherichia coli ve *Klebsiella* spp. başta idrar yolu enfeksiyonları olmak üzere en sık rastlanan enfeksiyon etkenlerinin başında gelmektedir[6]. Bu özellikleri ve özellikle toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonlarında kinolon grubu antibiyotiklerin ampirik olarak yaygın kullanımı nedeni ile bu bakteriler için kinolon grubuna karşı yüksek direnç oranları bildirilmektedir[1]. Bu çalışmada, hastanemize başvuran hastalardan etken olarak izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında en sık rastlanan kinolon direnç mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri

Şubat-Ağustos 2009 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (idrar, kan, yara ve yumuşak doku, solunum yolu, steril vücut sıvısı, vb.) elde edilen 628 izolatta (508 *E. coli* ve 120 *Klebsiella* spp.) kinolon direnci araştırıldı. Bakteri tanımlamaları geleneksel biyokimyasal testlerle (üç şekerli demirli besiyeri, Simmon'un sitratlı besiyeri, üre ve Motilite-indol-lizin besiyerinde biyokimyasal reaksiyonlar, indol pozitifliği ve hareket değerlendirmesi) yapıldı. İzolatlarda kinolon direnci taraması nalidiksik asit antibiyotik diski (Oxoid) ile yapıldı[7]. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Nalidiksik aside dirençli olan izolatlar için nalidiksik asit (Sigma-Aldrich, Almanya) ve siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Almanya) için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) agar dilüsyon yöntemiyle belirlendi[8]. İzolatların diğer antibiyotikler (ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefalotin, sefoksitin, sefotaksim, seftriakson, sefepim, imipenem, meropenem, amikasini gentamisin, tobramisim, trimetoprim-sulfame-toksazol) için antimikrobiyal duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı[7]. İzolatlarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi çift disk sinerji yöntemiyle belirlendi[9].

İzolatlarda kinolon direnci sağlayan gen mutasyonlarının ve direnç genlerinin gösterilmesi

İzolatlardan DNA eldesi ticari izolasyon kiti (EZ-10 Spin Column Genomic DNA MiniPreps Kit, Bio Basic, Kanada) kullanılarak yapıldı. *qnrA, qnrB, qnrS, aac(6')-Ib, gyrA, parC* gen bölgelerinin çoğaltılması için Tablo 1'de belirtilen primerler kullanıldı. *aac(6')-Ib* geni belirlenen izolatlarda *aac(6')-Ib-cr* varyantları BtsCI restriksiyon enzimi ile araştırıldı[10].

Tablo 1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri.

Gen Bölgesi	Forward Primer	Reverse Primer	Bant Büyüklüğü (bç)	Kaynak no
qnrA	5`-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3`	5`-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA-3`	516	(12)
qnrB	5`-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3'	5`-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3	469	(12)
qnrS	5`-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	5`-TAAATTGGCACCCTGTAGGC-3	417	(12)
aac(6)-Ib	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3'	5'-CTCGAATGCCTCCCGTGTTT-3'	482	(10)
gyrA	5'-TACACCGGTCAACATTGAGG-3'	5'-TTAATATTGCCGCCGTCGG-3'	648	(13)
parC	5'-AAACCTGTTCAGCGCCGCATT-3'	5'-GTGGTGCCGTTAAGCAAA-3'	395	(14)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için 1X PZR tamponu (200μM dNTP, 1.25mM MgCl2, 100 μg/ml sığır serum albümini) kullanıldı (pH 8.4). Her reaksiyon için 20 pmol/μl primer, 2.5U Taq DNA polimeraz (Bioron, İngiltere), 5 μl DNA konularak son reaksiyon hacmi 50 μl olacak şekilde steril distile su ile tamamlandı[11].

Amplifikasyon için Gene Amp PCR System 9700 Termal Cycler ve görüntüleme için Gel Doc UV görüntüleme sistemi (BioRad, İtalya), belirleyici (marker) olarak 100-bç'lik DNA Ladder (Sigma, Almanya) kullanıldı.

Nükleik asit dizileme

Kinolon dirençli izolatlar arasından rastgele seçilen 57 izolat için kinolon direncini tanımlayan bölge dizisi (*gyrA* ve *parC*) Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde (TÜBİTAK MAM GMBE) yapıldı. PZR ürünlerinin tamamı agaroz jelde yürütüldükten sonra, agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti (Roche, Katalog No. 11696505001) kullanılarak agaroz jelden saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA örneklerinin dizi analizi, ilgili genlere özgü primerler kullanılarak gerçekleştirildi. Beckman Coulter Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (DTCS) kullanılarak kurulan dizi reaksiyonlarında özgün "forward" veya "reverse" primerler 3.2 pmol ve kalıp PZR ürünleri 50 fmol konsantrasyonlarda kullanıldı. Dizi analizi başarılı olan tüm örneklere ait sonuçlar "fasta" ve "scf" olmak üzere iki farklı formatta elektronik olarak kaydedilerek tarafımıza gönderildi. Elde edilen protein dizileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) web sayfasında bulunan protein BLAST programıyla gen bankasındaki protein dizileriyle karşılaştırıldı[15].

İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Versiyon 13.0) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak belirtildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arası farklılıklar ki-kare testi ile incelendi. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan *E. coli* izolatları için nalidiksik asit ve siprofloksasin direnci sırasıyla %52 ve %28.1, *Klebsiella* türleri için ise sırasıyla %46.7 ve %21.1 bulunmuştur. Nalidiksik aside dirençli olan izolatların ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefalotin, sefepim, sefotaksim, sefuroksim, sefoksitin, gentamisin, tobramisin, amikasin, trimetoprim-sülfametoksazole karşı anlamlı olarak daha dirençli oldukları saptanmıştır ($p<0.001$). İzolatlarda karbapenem direncine rastlanmamıştır.

Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda nalidiksik asit için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri >256 μg/ml, siprofloksasin için ise >32 μg/ml bulunmuştur. Yatan hasta izolatlarında nalidiksik asit

Tablo 2. İzolatlarda belirlenen GSBL oranları.

	Tüm Bakteriler (n,%)			Nalidiksik Asit Dirençli/Orta Duyarlı (n,%)		
	Escherichia coli	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella oxytoca*	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella oxytoca*
GSBL Pozitif	190 (37.4)	36 (31.6)	1	165 (62.3)	23 (69.7)	1
GSBL Negatif	318 (62.6)	78 (68.4)	5	100 (37.7)	10 (30.3)	1
Toplam	508	114	6	265	33	2

direnci anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.049). Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%83.3), duyarlı olanlara göre (%16.7) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.001) (Tablo 2).

Kinolon direnci sağlayan gen mutasyonlarının ve direnç genlerinin belirlenmesi

gyrA için QRDR olarak tanımlanan Ala67-Gln106 arasında aminoasit dizilimleri incelendiğinde 57 izolatın tümünde 83. kodonda serin yerine lösin (Ser83Leu) ve bir izolat dışında 87. kodonda aspartat yerine asparajin (Asp87Asn), tek izolatta ise 87. kodonda aspartat yerine tirozin (Asp87Tyr) bulunduğu belirlenmiştir. *parC* için 57 izolatın hepsinde 80. kodonda serin yerine izolösin (Ser80Ile) geçişi olduğu belirlenmiştir. parC için ilave mutasyon olarak, 84. kodonda glutamat yerine 26 izolatta valin (Glu84Val), 4 izolatta glisin (Glu84Gly) ve iki izolatta alanin (Glu84Ala) geçişi olduğu belirlenmiştir.

aac(6')-Ib geni *E. coli* izolatlarının 99'unda (%37.4), *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) belirlenmiştir. *Klebsiella oxytoca* izolatlarında bu gen bölgesi bulunmamıştır. *aac(6')-Ib* pozitif olan *E. coli* izolatların ikisi dışında tümünün (%98) *aac(6')-Ib-cr* varyantı oldukları belirlenmiştir.

aac(6')-Ib geni saptanan *E. coli* izolatlarında tobramisin, gentamisin direnci ve GSBL üretimi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.001). Bu izolatlarda trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık belirlenmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.485).

İzolatlarda *qnr (qnrA, qnrB ve qnrS)* geni bulunmamıştır.

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan bildirimler kinolon direncinin dünyada ve ülkemizde oldukça yüksek düzeylere ulaştığını göstermektedir[16]. Çalışmamızda, siprofloksasin direnci *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları için sırasıyla %46.7 ve %21.1 olarak bulunmuştur. *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL üretimi ile florokinolon direnci arasında yakın ilişki olduğu bildirilmektedir[17-19]. Çalışmamızda da, kinolon dirençli izolatlarda GSBL üretimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.001). Çalışmamızda, GSBL belirlenmesi için kullanılan çift disk sinerji yöntemi CLSI tarafından önerilen referans yöntem olmamakla birlikte, çoğu suş için özellikle de diskler arası uzaklık 15-20 mm. arası olduğunda standart yöntemle uyumlu sonuç verdiği bildirilmiştir[20]. Kinolon direncinin en önemli mekanizması DNA giraz ve topoizomeraz IV genlerinde kinolon direncini tanımlayan bölgede oluşan mutasyonlardır. Topoizomeraz IV, kinolonlara DNA giraz kadar duyarlı olmaması nedeniyle Gram negatif bakteriler için ikinci hedeftir. Genellikle *gyrA* genindeki çift mutasyonlar (birinci sıklıkta 83, ikinci sıklıkta 87. kodonda) yüksek düzeyde

kinolon direncinin nedeni olarak bildirilmiştir. *E. coli*'de parC ve *parE* mutasyonlarının her zaman *gyrA* mutasyonları ile birlikte bulunması, topoizomeraz IV mutasyonlarının, DNA girazda gelişen mutasyonlarla oluşan azalmış kinolon duyarlılığı olmadan gelişmediğini göstermekte-dir[21]. Buna ilave olarak *parC* geninde oluşan tek veya çift mutasyonların artan kinolon direncinde tamamlayıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir[13,22]. Kinolon dirençli izolatlarımızın nalidiksik asit ve siprofloksasin için belirlenen $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri izolatlarımızda kinolon direncinin yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, ilaç hedeflerinde kinolon direncini belirleyen bölgelerde dizileme yapılan izolatların tümünde *gyrA* bölgesinde *Ala67-Gln106* arasında çift mutasyon olduğu, ilave olarak *parC* bölgesinde bu izolatların tümünde tek mutasyon bulunduğu saptanmış, ayrıca *parC* bölgesinde izolatların 32'sinde (%56) ilave mutasyonlar bulunduğu belirlenmiştir. Belirlenen mutasyonlar literatürde belirtilen sık rastlanan mutasyonlar ile uyumludur[23-25]. Bu konuda ülkemizde Eraç ve ark.[26] sekiz *E. coli* izolatında *gyrA* bölgesinde Ser83Leu değişimi saptamış, siprofloksasin duyarlı nalidiksik asit dirençli olan bir izolat hariç diğer izolatlarda ek olarak Asp87Tyr veya Asp87Asn mutasyonları olduğunu belirlemişlerdir. Güven Ö[27], sağlıklı çocukların dışkılarından elde ettiği nalidiksik asit ve siprofloksasin dirençli altı *E. coli* izolatında, *gyrA*'da çift mutasyon (*Ser83Leu ve Asp87Asn*) saptamıştır. Aynı çalışmada *parC* bölgesinde suşların hepsinde yine çift mutasyon (*Ser80Ile ve Ser83Tyr*) belirlenmiştir. Bu mutasyonlara ek olarak kökenlerin birinde *parC*'de *Glu84Gly*, bir diğerinde ise *Glu84Val* değişimi gözlenmiştir[27]. Belirlenen mutasyonlar bakımından bu çalışma bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda, daha önceki bildirimlerden farklı olarak *parC*'de *Glu84Ala* değişimi belirlenmiştir. Ayrıca izolatlarımızda ikinci en sık rastlanan mutasyon olarak *Glu84Val* değişimi gözlenmiş, Güven'in bildirdiği *Ser83Tyr* değişimi bulunmamıştır.

Çalışmamızda, hedef bölge değerlendirmesi yapılan izolatların yedisinde *gyrA* bölgesinde kinolon direncini tanımlayan bölge dışında 162. kodonda daha önce bildirilmeyen mutasyonun (*Lys162Gln*) yer aldığı gözlenmiştir. Literatüre bakıldığında *gyrA*'da QRDR dışında saptanmış mutasyonlar (*Ala196Glu, Ala51Val*) bildirildiği gözlenmiş, ancak bunların kinolon direnci ile ilişkisi kesin olarak belirlenmemiştir[28,29].

1998 yılında çoğul dirençli bir *K. pneumoniae* izolatında *qnrA* geninin gösterilmesi ile birlikte, kinolon direncinin plazmidle ilişkili olabildiği gündeme gelmiş ve büyük ilgi uyandırmıştır[30]. Qnr proteinleri pentapeptid yine ailesinin bir üyesi olup, DNA giraz ve topoizomeraz IV'e bağlanarak bu hedef bölgeleri kinolonların inhibitör etkisinden korumaktadır. Tanımlanmış olan ilk protein 218 aminoasit içeren QnrA'dır. Bundan sonra iki protein daha tanımlanmıştır. Bunlar QnrA ile sırasıyla %40 ve %59 aminoasit benzerliği gösteren QnrB ve QnrS proteinleridir. Qnr proteinleri başta *K. pneumoniae* ve *Enterobacter* spp. başta olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyelerinde değişik üyelerden bildirilmektedir. Qnr taşıyan plazmidler aynı zamanda GSBL de taşımaktadır. Dünya genelinde bu konuyla ilgili yapılmış çalışmalara bakıldığında, Norveç ve İsveç'te *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında *qnr* prevalansı[31] sırasıyla %0.7 ve %7.7, Danimarka'da[32] %1.63, Fransa'da GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında (33,34) %1.6, Kanada'da siprofloksasin ve/veya tobramisine dirençli *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında %1 bulunmuştur[35]. İspanya[36] (%5), Çin[37] (%8) ve Amerika[12,14] (%15) gibi bazı ülkelerde daha yüksek prevalanslar belirlenmiştir. *Klebsiella* spp. izolatlarında qnr gen prevalansının *E. coli*'ye göre daha yüksek olduğu yapılan bazı çalışmalar da dikkat çekmektedir. Örneğin, Fransa'da *E. coli* izolatla-

rının %0.63'ünde, *Klebsiellae* spp. izolatlarının ise %7'sinde *qnr* genleri bulunmuştur[33]. Yine benzer şekilde Karah ve ark.[31] *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında qnr genlerinin prevalansını sırasıyla % 0.7 ve %7.7 olarak bulmuştur. Ülkemizde bu konuyla ilgili olarak az sayıda çalışma yapılmış olması ve yapılan bu çalışmalarda incelenen izolat sayısının da düşük olması nedeniyle *qnr* genlerinin sıklığı hakkında kısıtlı veri bulunmaktadır. Türkiye'de *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları ile yapılmış çalışmalara bakıldığında, *qnr* genlerinin, ya bu çalışmada olduğu gibi hiç bulunamadığı ya da düşük bildirim oranlarının bulunduğu görülmektedir[27,38,39]. Nazik ve ark.[39] 2008 yılında yoğun bakım izolatı olan 460 Gram negatif bakterinin üçünde (%0.65) *qnr* geni (bir *qnrB1* ve iki *qnrS1*) saptanmıştır. Poirel ve ark.[40] Türkiye'de farklı hastanelerde izole edilen ve GSBL oluşturan 138 *E. coli* ve 110 *K. pneumonia*e izolatından yalnızca birinde *qnrB1* geni saptamışlardır. Öktem ve ark.[41] kan kültürlerinden izole edilen nalidiksik asite dirençli 356 *Enterobacteriaceae* üyesinin olan ve altısında *qnrA*, üçünde *qnrS* geni saptamışlardır. *qnrA* saptanan suşların ikisinin ve *qnrS* saptanan suşların birinin GSBL pozitif belirlendiği bu çalışmada, literatürle uyumsuz olarak GSBL negatif kökenlerdeki sıklık daha yüksek bulunmuştur[41]. Yine Öktem ve ark.[42] bir başka çalışmada, hepsi kinolon dirençli ve GSBL pozitif kan kültürü izolatı olan 34 *E. coli*'nin birinde ve 44 *K. pneumoniae*'nın dördünde *qnrA* saptamışlar, *qnrA* pozitiflik oranını %6.4 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *qnrB* ve *qnrS* genleri bulunmamıştır[42]. Nazik ve ark.[43] yaptıkları başka bir çalışmada, 971'i *Enterobacteriaceae* üyesi, 73'ü non-fermentatif Gram negatif çomak olmak üzere toplam 1044 izolatta üç *qnrA*, iki *qnrB*, bir *qnrS* geni bildirmiş, qnr genlerinin GSBL üreten izolatlarda daha sık olduğunu gözlemişlerdir. Özgümüş ve ark.[44] Türkiye'nin kuzeydoğu bölgesindeki on nehirden aldıkları su örneklerinden izole ettikleri 88 *E.coli* ve 35 *K. pneumoniae*'da birer *qnrS* geni bulmuşlardır. Araştırmacılar nehirler gibi çevresel kaynakların çoğul dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri için bir rezervuar rolü oynayabileceğini vurgulamışlardır[44]. Güven Ö[27], sağlıklı çocukların dışkılarında kinolon dirençli *E. coli* taşıyıcılığı ve direnç mekanizmalarını saptamak amacıyla yaptığı araştırmada, kinolon direnci saptadığı 15 *E. coli* izolatında *qnr* geni saptamamıştır. Avrupa'daki çalışmalarda[31,33,45], genellikle *qnrS* ve *qnrB* genleri baskın görülmekle birlikte, İngiltere'de yapılmış olan bir çalışmada[46], *qnrA* geni, İspanya'da yapılmış olan bir çalışmada[36] ise, *qnrA1* geni yüksek oranda belirlenmiştir. Türkiye'de *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarıyla yapılan çalışmalara bakıldığında, *qnrA*'nın, *qnrS* ve *qnrB* genlerine göre daha yüksek oranda görüldüğü, *qnrS* ve *qnrB* genlerininse birbirine yakın oranlarda görüldüğü gözlenmektedir. Çalışmamızda, incelenen izolatlarda plazmid kaynaklı kinolon direnci saptanmamıştır.

Plazmid geçişli direnç genlerinden diğeri, siprofloksasin ve norfloksasin gibi piperazinil grubu taşıyan kinolonların enzimatik inaktivasyonu ile gerçekleşmektedir. *aac(6')-Ib* geni kanamisin, tobramisin ve amikasin direncine neden olan bir aminoglikozit asetiltransferazı kodlamaktadır. Bu genin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni ise, *aac(6')-Ib*'den *Trp102Arg* ve *Asp179Tyr* farklılığı göstermektedir. Enzim bu şekilde siprofloksasini asetilleme yetisi kazanmaktadır. *qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* aynı hücrede birlikte bulunduklarında *qnr*'nin yalnız başına yaptığından dört kat daha fazla MİK artışı oluşmakta, duyarlılık bakımından klinik direnç sınırına (1 μg/ml) yaklaşılmaktadır. Bunun yanı sıra *aac(6')-Ib-cr*'nin yalnız bulunması, siprofloksasine maruz kalma durumunda oluşacak kromozomal mutasyon sıklığını arttırmaktadır[47]. *qnr, aac(6')-Ib-cr* ve *CTX-M* genlerinin aynı plazmid üzerinde lokalize olarak birlikte aktarılabildiği gösterilmiştir[37,48]. Dolayısıyla bu mekanizma GSBL üreten izolatlarda yüksek

kinolon direncinin açıklanmasına katkı sağlamıştır. Türkiye'de *aac(6')-Ib-cr* geninin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Poirel ve ark.[40] Türkiye'den gönderilen GSBL oluşturan *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının % 78'inde *aac(6')-Ib-cr* bulunduğunu göstermişlerdir. Nazik ve ark.[43] ikisi *qnrB*-pozitif *K. pneumoniae*, biri qnrA pozitif *E. coli* olmak üzere üç suşta *aac(6')-Ib-cr* geni saptamışlardır. Çalışmamızda *E. coli* izolatlarının 99'unda (%37.4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiş, bunların da 101'i (%98) *aac(6')-Ib-cr* bulunmuştur. İzolatlarımızdaki GSBL üretimi ile *aac(6')-Ib* gen varlığı arasındaki ilişki istatiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). *aac(6')-Ib* geni saptanan izolatlar incelendiğinde tobramisin ve gentamisin direnci istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Bu izolatlarda trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık tespit edilmiş, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.485$). *aac(6')-Ib* pozitif türlerin ek olarak trimetoprim-sulfametoksazole de azalmış duyarlılık göstermesi *aac(6')-Ib-cr*'nin genellikle kompleks integronlarda bulunması[49] ve bu integronların 3'-CS bölgelerinin sul1 geni kodlaması[50] ile açıklanmaktadır.

Sonuç olarak izolatlarımızda kinolon direnci *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatları için sırasıyla %46.7 ve %21.1 olarak bulunmuş, bu izolatlardaki direnç düzeyinin yüksek olduğu belirlenmiş, GSBL üretimi anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. İlaç hedef bölgesi değerlendirilen dirençli izolatlarımızın tümünde üç ve yarıdan fazlasında dört mutasyon bulunmuş, izolatlarımızda %37.4 oranında *aac(6')-Ib-cr* mevcudiyeti belirlenmiştir. Kinolon dirençli izolatlarımızda yüksek düzey kinolon direnci belirlenmiş, bununla ilişkili ve literatürle uyumlu olarak temel kinolon direnç mekanizmasının ilaç hedef bölgesindeki çoklu mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Fonu (Proje No: 2009-20-01-14) tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmada kullanılan pozitif kontrol izolatlarını bize sağlayan Prof. Dr. Zeynep Gülay'a ve PZR deneylerinde yardımcı olan Bio. Eldan Subaşı'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Dündar D, Willke A, Sonmez G.** İdrar yolu infeksiyonu etkenleri ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Klimik Derg* 2008; 21:7-11.
2. **Jacoby GA.** Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005;41:120-6. https://doi.org/10.1086/428052
3. **Li XZ.** Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:453-63. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.04.002
4. **Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al.** New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3354-60. https://doi.org/10.1128/AAC.00339-07
5. **Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:664-89.
6. **Eisenstein BI, Zaleznik DF.** *Enterobacteriaceae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Churchill Livingstone Philadelphia, 2000; 2294-2310.
7. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Tenth Edition. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
8. **CLSI.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
9. **Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A.** Extended-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*; hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Inf Dis* 1988; 10:867-78.
10. **Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC.** Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3953-5.
11. **Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ.** Moleküler mikrobiyoloji tanı prensipleri ve uygulamalar, (Ed'ler) Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Palme Yayıncılık. Ankara, 2006.
12. **Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC.** Qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States.

Antimicrob Agents Chemother 2006, 50:2872-4.

13. **Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C.** Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51:1001-5.
14. **Vila J, Ruiz J, Go-i P, de Anta MT.** Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:491-3.
15. BLAST. National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
16. **de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H.** The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:860-8. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12028
17. **Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, et al.** Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000; 30:473-8. https://doi.org/10.1086/313719
18. **Lautenbach E, Fishman NO, Bilker WB, et al.** Risk factors for fluoroquinolone resistance in nosocomial *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections. *Arch Intern Med* 2002; 162:2469-77. https://doi.org/10.1001/archinte.162.21.2469
19. **Kang CI, Kim SH, Park WB, et al.** Clinical epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to broad-spectrum cephalosporin resistance in bloodstream infections caused by *Enterobacter* species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:88-92. https://doi.org/10.1086/502492
20. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum β-lactamases:a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:657-86. https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
21. **Ruiz J.** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1109-17. https://doi.org/10.1093/jac/dkg222
22. **Fendukly F, Karlsson I, Hanson H. S, Kronvall G, and Dornbusch K.** Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *APMIS* 2003; 111:857-66. https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110904.x
23. **Betitra Y, Teresa V, Miguel V, Abdelaziz T.** Determinants of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in Bejaia, Algeria. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7:462-7. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60075-4
24. **Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ.** Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 2:358-73. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006
25. **Chakrabarty RP, Sultana M, Shehreen S, Akter S, Hossain MA.** Contribution of target alteration, protection and efflux pump in achieving high ciprofloxacin resistance in *Enterobacteriaceae*. *AMB Express* 2016; 6:126. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0294-9
26. **Eraç B, Gill A, Amyes SGB, Gülay Z.** Siprofloksasine dirençli *Escherichia coli* suşlarında *Gyr* A mutasyonlarının incelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37:125-30.
27. **Güven Ö.** Sağlıklı çocuklarda dşkıda kinolon dirençli *Escherichia coli* taşıyıcılığının ve direnç mekanizmalarının saptanması. [Yüksek Lisans Tezi] İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
28. **Komp Lindgren P, Karlsson Å, Hughes D.** Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3222-32. https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3222-3232.200
29. **Griggs, DJ, Gensberg K, Piddock LJ.** Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from human and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1009-13.
30. **Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351:797-9. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4
31. **Karah N.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in Norwegian and Swedish clinical isolates of *Escherchia coli* and *Klebsiella* spp. [Master's Thesis in Medical Microbiology] Tromsø, Norveç: Department of Microbiology and Virology Institute of Medical Biology University of Tromsø, 2008.
32. **Cavaco LM, Hansen DS, Friis-Møller A, Aarestrup FM, Hasman H, Frimodt-Møller N.** First detection of plasmid-mediated quinolone resistance (*qnrA* and *qnrS*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans in Scandinavia. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:804-5. https://doi.org/10.1093/jac/dkl554
33. **Poirel L, Leviandier C, Nordmann P.** Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA* and *QnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3992-7. https://doi.org/10.1128/AAC.00597-06
34. **Cattoir V, Poirel L, Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrB4* in France from an *Enterobacter cloacae* clinical isolate co-expressing a QnrS1 determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:2652-53. https://doi.org/10.1128/AAC.01616-06
35. **Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB.** Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(5): 999-1002.
36. **Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, et al.** Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β-lactamase producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:291-5. https://doi.org/10.1093/jac/dkm448
37. **Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, et al.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-ib-cr*

in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:1003-6. https://doi.org/10.1093/jac/dkn063

38. **Nazik H, Poirel L, Nordmann P.** Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2146-7. https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2146-2147.2005
39. **Nazik H, Öngen B, Kuvat N.** Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among isolates obtained in a Turkish intensive care unit. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:310-2.
40. **Poirel L, Gür D, Minarini L, Arslan U, Nordmann P.** Molecular epidemiology of plasmid mediated quinolone resistance determinants in extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from Turkey. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, İspanya, 2008: P1527.
41. **Öktem MA, Biçmen M, Gülay Z.** Kan kültürlerinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında plazmit ile ilişkili kinolon direnci genlerinin saptanması, 8. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı, İstanbul, 2008: P28.
42. **Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, Gur D, HITIT Project Study Group.** *qnrA* prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:13-7.
43. **Nazik H, İlktaç M, Öngen B.** Prevalence of *qnrA, qnrB, qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* (in qnr-positive isolates) among the ESBL-positive and/or ciprofloxacin-resistant isolates in Turkey. *J Chemother* 2009; 21:219-21. https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.2.219
44. **Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N.** Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in Northern Turkey. *J Microbiol* 2009; 47:19-27. https://doi.org/10.1007/s12275-008-0206-z
45. **Chen YT, Shu HY, Li LH, et al.** Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum-β-Lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3861-6. https://doi.org/10.1128/AAC.00456-06
46. **Corkill JE, Anson JJ, Hart CA.** High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:1115-7. https://doi.org/10.1093/jac/dki388
47. **Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al.** Fluoroquinolone modifying enzyme: a novel adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12:83-8.
48. **Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:664-89. https://doi.org/10.1128/CMR.00016-09
49. **Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** Plasmid mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2242-8. https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2242-2248.2003
50. **Bennett PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:1-4. https://doi.org/10.1093/jac/43.1.1

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):185-189, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.185

Araştırma

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda *Varisella* Zoster Virüs Serolojik Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Münevver KAYIN, Çağla Yıldız ALAGÖZ, Ayşın ZEYTİNOĞLU, İmre ALTUĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: *Herpesviridae ailesinin bir üyesi olan varisella zoster virüs (VZV) klinikleri farklı olan varisella (suçiçeği) ve zona (herpes zoster) hastalıklarının etiyolojisinden sorumlu bir virüstür. Doğru tanı ile tedavi edilebilir bir enfeksiyon etkeni olan VZV antiviral-lere duyarlıdır. Serolojik tanıda VZV IgG testi özellikle kişinin etkenle karşılaşıp karşılaşmadığını göstermek açısından önemli-dir. VZV IgG avidite testleri eski enfeksiyonu ayırt etmede yararlı-dır, ancak henüz standart değildir. Bu çalışmanın amacı, rutin tanıda yeni kullanmaya başladığımız VZV IgM ve IgG enzim immunoassay (EIA) testlerinin ve VZV IgG avidite testinin değer-lendirilmesi ve rutin laboratuvar tanı yaklaşımımızı belirlenmesi-dir.*

Gereç ve Yöntem: *Viroloji laboratuvarına VZV enfeksiyonu ön tanısı ya da viral tarama testleri istemi nedeniyle gelen 5884 VZV IgG ve 3570 VZV IgM testi, VZV IgG testi uygulandı.*

Bulgular: *Üç bin beş yüz yetmiş örnekte uygulanan VZV IgM tes-tinin %7.6'sı (273 örnek) pozitif, %3.4'ü (120 örnek) sınır değer ve %89 (3177) negatif olarak bulundu. VZV IgG testinde de pozitif, negatif ve sınır değer olarak saptanan hasta sayısı sırası ile 4251 (%72.2), 1363 (%23.2) ve 270 (%4.6) idi. Klinik olarak suçiçeği düşünülmeyen ancak VZV IgM testi yinelendiğinde de pozitif çıkan 15, suçiçeği kliniği olan ve VZV IgM testi pozitif saptanan iki ve VZV IgM testinin sınır değer çıkıp yinelendiğinde pozitif/sınır değer/negatif çıkan 7, toplam 24 örnekte VZV IgG avidite testi çalışıldı. Olguların hiçbirinde düşük avidite indeksi saptanmadı. Dört olguda avidite indeksi sınır değer olarak saptandı. Tüm diğer örneklerde avidite indeksi yüksek saptandı.*

Sonuç: *Klinik enfeksiyonun bulunmadığı durumlarda, akut enfeksiyon tanısının onaykanmasında, VZV IgM EIA testinin uygun bir test olmadığı düşünülmektedir. VZV IgM testlerinin beklenmedik pozitifliği, izotip antikorların saptanmasındaki standardizasyon eksikliği ile ilgilidir. VZV IgG avidite testi tanı-da yardımcı değildir. Bu çalışmada, VZV IgM ve IgG avidite EIA testlerinin akut enfeksiyon tanısında yararının sınırlı olduğu sonucuna varılmıştır.*

Anahtar kelimeler: *VZV, seroloji, avidite*

ABSTRACT

Evaluation of Varicella Zoster Virus Serologic Test Results in Patients Admitted to Ege University Faculty of Medicine

Objective: *Varicella zoster virus (VZV) is a member of Herpesviridae family and is the responsible etiological agent in two clinical forms as varicella (chicken pox) and zona (herpes zoster). VZV which is the infectious agent of a treatable infection based on accurate diagnosis is susceptible to antivirals. Serologic VZV IgG avidity test is important as VZV Ig G test shows whether the patient has ever acquired this infectionVZV IgG avidity test helps to distinguish recent infection from the past; but is not standardized yet. The aim of this study is to evaluate the VZV IgM and IgG enzyme immunoassay (EIA) tests and VZV IgG avidity test which we have started to use routinely and to determine our routine laboratory diagnostic approach.*

Material and Methods: *A total of 5884 VZV IgG and 3570 VZV IgM test and VZV IgG avidity test were performed in the patients' sera with the pre-diagnosis of VZV infection or request for viral screening tests.*

Results: *In this study, of the 3570 samples tested with VZV IgM; 7.6% (273 samples) were positive, 3.4% (120 samples) were borderline and 89% (3177) were negative. The number of VZV IgG positive, negative, and borderline results were 4251 (72.2%), 1363 (23.2%) and 270 (4.6%) respectively. VZV IgG avidity test was performed in a total of 24 samples including 15 samples clinically not thought to be associated with varicella yet repeated VZV IgM test result was positive for the disease, 2 samples of the patients with clinical manifestations of varicella, and 7 samples of the patients whose initial VZV IgM test gave borderline positivity, however when the test was repeated it yielded positive/borderline/ negative result. Lower avidity indices were not detected in any case, In only 4 cases borderline avidity index value was detected., while the remaining samples had high avidity indices.*

Conclusion: *In conclusion the VZV IgM enzyme immunoassay test is not considered to be a suitable test in the confirmation of the diagnosis of acute infection in the absence of clinical infection . Unexpected positivity in VZV IgM tests is related to the lack of standardization of EIA for the detection of these isotype antibodies. The VZV IgG avidity test has not helped for the diagnosis. The utility of VZV IgM and IgG avidity EIA tests were considered to be limited in diagnosing acute infection.*

Keywords: *VZV, serology, avidity*

Alındığı tarih: 07.02.2017
Kabul tarihi: 21.07.2017
Yazışma adresi: Münevver Kayın, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir
e-posta: munevver.kayin@outlook.com

GİRİŞ

Herpesviridae ailesinin bir üyesi olan varisella zoster virüs (VZV) klinikleri farklı olan varisella (suçiçeği) ve zona (herpes zoster) hastalıklarının etiyolojisinden sorumlu bir virüstür. VZV, primer enfeksiyonu suçiçeğinden sonra dorsal kök veya kraniyal sinir gangliyonlarında latent hâlde kalır ve hücresel bağışıklığın baskılanması durumunda reaktivasyon görülebilir[1,2]. Doğru tanı ile tedavi edilebilir bir enfeksiyon etkeni olan VZV antivirallere duyarlıdır. Bu nedenle VZV enfeksiyonlarında klinik ya da mikrobiyolojik tanı önemlidir. VZV primer enfeksiyonu olan suçiçeği olgularında klinisyenin tanı yaklaşımı genellikle tipik olan kliniğin değerlendirilmesi ile yapılmaktadır. Ancak atipik enfeksiyonun izlendiği immunsuprese olgularda, aşılanmış kişilerde görülen atipik enfeksiyonlarda ve aşı suşunun neden olabileceği olgular gibi klinik tanının yetersiz kalabileceği durumlarda, VZV'nin mikrobiyolojik tanısı gereklidir[1,2].

Mikrobiyolojik tanı; suçiçeği salgınlarında etkeni belirlemek, fatal seyreden olgularda kesin tanıyı koymak ve özellikle üçüncü basamak sağlık sisteminde, immünsuprese olguların VZV enfeksiyonuna duyarlılığını taramak için (Örn. transplantasyon alıcı/vericilerde vb.) önemlidir. İmmunkompetan hastada tanıda, viremi kısa süreli olduğundan, kanda VZV DNA'nın saptanması sorunludur. VZV enfeksiyonu tanısında lezyonlardan dev hücrelerin gösterilmesi (Tzanck), Cowdry A inklüzyonlarının belirlenmesi yararlı olabilir. Lezyonda PCR ile genomun saptanması, duyarlılık ve özgüllük açısından en yeğlenen yöntemdir. Serolojik tanıda VZV IgG testi özellikle kişinin etkenle karşılaşıp karşılaşmadığını göstermek açısından önemlidir. Ancak, enfekte tüm hücreyi kullanan rutin IgG testleri doğal geçirilmiş enfeksiyonu saptamada başarılı olmakla birlikte, aşı sonrası antikorları saptamada duyarlılığı düşüktür. Antikor saptanmasında, saflaştırılmış glikoprotein (gpELISA) ve membran antijenlerini floresan yöntemle saptayan (FAMA) testleri de kullanılmaktadır. Aşılı ve aşısız olgulara yönelik IgG testleri ile ilgili standardizasyonlar sürmektedir. VZV IgG avidite testleri eski enfeksiyonu ayırt etmede yararlıdır, ancak henüz standart değildir. Suçiçeğinde VZV IgM testinin duyarlılığı, lezyon örneğinden VZV DNA'nın gösterilmesine göre düşüktür. Duyarlılığın, lezyonda VZV DNA saptanmasına göre düşük olması ve akut enfeksiyonda klinisyenin klinik tablo ile karar verme eğilimi nedeniyle VZV IgM testi rutin kullanımda yerini alamamıştır. Yine, testin yalancı negatifliği ve reenfeksiyon/reaktivasyon ile akut enfeksiyonu ayıramaması testin kullanımını sorunlu hâle getirmektedir. Ancak, döküntüsü olan olgularda VZV IgM pozitifliği varisella tanısı için laboratuvar tanıyı koydurur[1-3].

Bu çalışmanın amacı, rutin tanıda yeni kullanmaya başladığımız VZV IgM ve IgG enzim immunoassay (EIA) testlerinin ve VZV IgG avidite testinin değerlendirilmesi ve rutin laboratuvar tanı yaklaşımımızı belirlenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'na, VZV enfeksiyonu ön tanısı ya da viral tarama testleri istemi nedeniyle 16.9.2011-31.12.2015 tarihlerinde gelen 5884 VZV IgG ve 3570 VZV IgM testi değerlendirmeye alındı. VZV IgG testi, 3115 kadın ve 2769 erkek, VZV IgM testi ise 1863 kadın ve 1707 erkek olguda uygulandı.

Örneklerden *Varisella* IgG ve *Varisella* IgM, Diesse (Diagnostica Senese S.p.A, İtalya) kitleri ile Chorus Trio (Diagnostica Senese S.p.A, İtalya) platformunda kit üretici talimatına göre çalışıldı ve indeks değeri 1.1'in üzerindeki olgular pozitif, 0.9'un altındakiler negatif; 0.9-1.1 arasındakiler sınır değer olarak yorumlandı.

VZV IgG avidite indeksi katı-faz immunanalitik bir test (ELISA-VIDITEST Anti-VZV IgG and IgG Avidity, Çek Cumhuriyeti) ile belirlendi. Örnekler kit talimatına göre çalışıldı ve "relative avidity index" (RAI) belirlendi. RAI %40'ın altında ise düşük aviditeli, %40-60 arasında ise sınır değer, %60'ın üzerinde ise yüksek aviditeli antikor olarak değerlendirildi.

BULGULAR

VZV IgG ve VZV IgM testinde yaşlar sırasıyla 1-95 (ort 23.05 yaş) ve 1-95 (22.73 yaş) idi. Üç bin beş yüz yetmiş örnekte uygulanan VZV IgM testinin %7.6'sı (273 örnek) pozitif, %3.4'ü (120 örnek) sınır değer ve %89 (3177) negatif olarak bulundu. VZV IgG testinde de pozitif, negatif ve sınır değer olarak saptanan hasta sayısı sırası ile 4251 (%72.2), 1363 (%23.2) ve 270 (%4.6) idi.

Klinik olarak suçiçeği düşünülmeyen ancak VZV IgM testi yinelendiğinde de pozitif çıkan 15, suçiçeği kliniği olan ve VZV IgM testi pozitif saptanan iki ve VZV IgM testinin sınır değer çıkıp yinelendiğinde pozitif/sınır değer/negatif çıkan 7, toplam 24 örnekte VZV IgG avidite testi çalışıldı. Olguların hiçbirinde düşük avidite indeksi saptanmadı. Dört olguda avidite indeksi sınır değer olarak saptandı. Tüm diğer örneklerde avidite indeksi yüksek saptandı. IgG avidite indeksi araştırılan örnekler tabloda gösterilmiştir.

VZV IgM pozitif olan olguların 18'inde HSV1+2 IgM bakılmış ve 8'inde eşzamanlı pozitiflik saptanmıştır. Yine, EBV VCA IgM bakılan 167 örneğin 13'ünde ve CMV IgM testi yapılan 208 örneğin 34'ünde VZV IgM ile birlikte pozitiflik saptanmıştır.

TARTIŞMA

Ülkemizde suçiçeği seroprevalansı çalışmaları ve hastalık komplikasyonlarına bağlı hastane yatışların değerlendirildiği çok merkezli çalışmalar yapılmıştır. Suçiçeği epidemiyolojisi ile ilgili kapsamlı bir çalışmada, dokuz ilde randomize seçilen 4800 kişide, 30 yaş altı olanlarda seroprevalans %77.8 olarak saptanmıştır[4]. İzmir'de aşı öncesi yapılan iki farklı çalışmada, VZV seroprevalans oranları %71.5 ve %94.3 olarak belirlenmiştir[5,6]. Erzurum'da yapılan bir diğer çalışmada, 30 yaş altı kişilerde seroprevalans %78, Manisa ilinde yapılan bir diğer çalışmada, 7-15 yaş arasında VZV IgG pozitiflik oranı %61.6, Ankara'da adolasanlarda yapılan çalışmada, %55.7 ve Adana'da ilk öğretim öğrencilerinde %78 olarak bulunmuştur[7-9]. Yine rutin aşılama öncesi dönemde, 0-15 yaş arası çocuklarda *varisella* ile ilgili hospitalizasyon oranı 100.000'de 5.29-6.89 olarak bulunmuştur[10]. Türkiye'de Şubat 2013'te çocuklara VZV aşısı uygulanmaya başlanmıştır. Çalışmamızda, yaşları 1 ile 95 arasında değişen (ortalama değer 23.05 yaş) hasta grubunda Varisella IgG olumlu-

Tablo. VZV IgG avidite testi ile indeks araştırılan 24 örneğin sonuçları.

VZV IgM	Örnek sayısı	Yüksek AI	Sınır AI	Düşük AI
VZV IgM Birinci çalışma (+) İkinci çalışma (+)	15	14	1*	0
Suçiçeği kliniği olan ve VZV IgM (+)	2	0	2	0
VZV IgM Birinci çalışma SD İkinci çalışma (+)/SD/(-)	7	6	1**	0
Toplam	24	20	4	0

*AI: avidite indeksi; SD: sınır değer; * Kawasaki sendrom tanısı alan bir olgu ** birinci çalışma SD, ikinci çalışma (-) bir olgu*

luğu oranı diğer çalışmalarla uyumlu olarak, %72.2 olarak bulunmuştur.

VZV enfeksiyonu mikrobiyolojik tanısında farklı laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Hastalığın erken döneminde veziküllerin PCR ile test edilmesinin tanıda duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir[11,12]. Yine oral sürüntü örneklerinin de PCR ile test edilmesi oldukça duyarlı bir yöntem olarak bildirilmektedir[13]. Tanıda hücre kültürü ile virüs izolasyonu zaman alıcı olması ve düşük duyarlılığı nedeni ile yaygın olarak kullanılmamaktadır[12]. Diğer laboratuvar tanı yöntemlerinden lezyonun direkt floresan antikor yöntemi (DFA) ile incelenmesi hem deneyimli personel gerektirmesi, belirsiz sonuç elde edilebilmesi ve hem de duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeni ile tanıda çok yararlı olamamaktadır. Serolojik testler ile IgG saptanması kişideki immüniteyi belirlemek açısından kullanılmaktadır. IgG titresinde artışı gözlemlemek açısından iki farklı örnek gerektiğinden akut hastalık tanısında rolü kısıtlıdır. Ek olarak aşı veya daha önce geçirilmiş enfeksiyon nedeni ile antikoru olan hastalarda IgG tiresindeki artışı göstermek zor olabilmektedir. Primer enfeksiyon sırasında kan alındığı sırada IgG henüz oluşmamış olabilir[13]. VZV aktif enfeksiyonunu desteklemek için pratikte VZV IgM kullanılmakla beraber IgM antikorlarını saptayan pek çok ticari kitin duyarlılıklarının değişken olabildiği, diğer yandan başta HSV olmak üzere diğer herpesvirüslerle yalancı pozitiflik verebildiği belirtilmektedir[14]. Bu çalışmada, VZV IgM olumluluğu olan bazı hastalarda eş zamanlı HSV 1+2 IgM, EBV VCA IgM ve CMV IgM saptanması bunun bir göstergesidir. Yine, VZV IgM varlığı, yakın dönem karşılaşmanın göstergesi olabildiği gibi reenfeksiyon ve reaktivasyona da bağlı olabilmektedir[15]. IgG avidite testleri primer enfeksiyon (varisella) ve reküren enfeksiyon (zoster) ayrımında yardımcı olabilmekle beraber, deneyim sınırlıdır[16].

Leung ve ark.[13], Varisella enfeksiyonunun tanısında kullanılan farklı laboratuvar testlerinin değerlendirildiği ve veziküllerden alınan örneğin PCR ile saptanmasının altın standart olarak tanımlandığı çalışmada, vezikülden DFA ile antijen saptanmasının duyarlılığını % 75, kanda IgM saptanması duyarlılığını %25, kanda PCR duyarlılığını %42 olarak belirlemiştir. Aynı çalışmada, klinik tanının duyarlılığı aşısızlarda %100 aşı ile modifiye olmuş olgularda %85 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada, 3570 örnekte uygulanan VZV IgM testinin %7.6'sı (273 örnek) pozitif, %3.4'ü (120 örnek) sınır değer olarak bulunmuştur. Pozitif olarak saptanan hastaların ön tanıları incelendiğinde 11 hastanın suçiçeği ve üç hastanın zona zoster (pozitif çıkan 273 örneğin %5.1'i) ön tanısı ile yollandığı gözlenmiştir. Diğer yandan suçiçeği ön tanısı ile yollanan 25 hastanın 14'ünde VZV IgM pozitif olarak saptanmamıştır. VZV enfeksiyonu laboratuvar tanısında, diğer çalışmalarda sözü edilen sorunlar bu çalışmada da gözlenmiş, VZV IgM sonuçlarının klinik hastalık tanısı ile uyum içinde olmadığı ve saptanan IgM olumluluklarının çoğunun primer enfeksiyonun göstergesi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, VZV IgG avidite testi uygulanan olgu sayısı sınırlıdır. Çalışılan 24 hasta örneğinin yalnızca 4'ünde sınır değer avidite elde edilmiş, geriye kalan örneklerde yüksek avidite saptanmıştır. Sınır değer elde edilen 2 olgu suçiçeği kliniği olan olgulardır. Bu bulgular elde edilen pozitifliklerin çoğunun yakın dönem enfeksiyon olmadığını düşündürmektedir. Diğer yandan klinik bulgusu olan hastalarda yüksek avidite elde edilmesi beklenmeyen bir durum olmuştur. Sınırlı sayıda uygulanan avidite testi sonuçlarının tanıya yararı olmamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada uygulanan VZV IgM enzim immunoassay testi laboratuvar tanı-

da klinik hastalığın olmadığı durumlarda akut enfeksiyonu doğrulama için uygun bir test olarak görülmemektedir[17]. Gerekli olmadığı durumlarda istenen VZV IgM testlerinde beklenmedik IgM pozitiflikleri, bu izotip antikorların saptanmasında enzim immunoassay testlerinin henüz standardize olmaması ile ilgilidir. VZV IgG avidite testi tanıyı netleştirme konusunda yardımcı olmamıştır. Bu çalışmada, VZV IgM ve IgG avidite EIA testlerinin akut enfeksiyon tanısında yararının sınırlı olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Rosenthal KS, Pfaller MA.** Medical Microbiology, Murray PR, 6th Ed., ABD: Mosby Elsevier, 2008.
2. **Whitney RJ.** Chickenpox and Herpes Zoster (Varicella-Zoster Virus). In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th Ed., Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (Eds) 2015, Elsevier USA 2015; 1731-8.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Erişim Tarihi:10.01.2017 Available from: http://www.cdc.gov.chickenpox/hcp/lab-tests.html
4. **Kanra G, Tezcan S, Badur S, Turkish National Study Team.** Varisella seroprevalence in a random sample of the Turkish population. *Vaccine* 2002; 20:1425-8. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00459-5
5. **Kose S, Mandiracioglu A, Senger SS, et al.** Seroprevalence of varisella-zoster virus in the prevaccine era: a population-based study in Izmir, Turkey. *J Infect Public Health* 2013; 6:115-9. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2012.10.003
6. **Koturoglu G, Kurugol Z, Turkoglu E.** Seroepidemiology of varisella-zoster virus and reliability of varisella history in Turkish children, adolescents and adults. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011; 25:388-93. https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2010.01180.x
7. **Dinleyici EC, Kurugol Z, Turel O, et al.** Epidemiology and economic impact of varisella-related hospitalizations in Turkey from 2008 to 2010: a nationwide survey during the pre-vaccine era (VARICOMP study). *Eur J Pediatr* 2012; 171:817-25. https://doi.org/10.1007/s00431-011-1650-z
8. **Leung J, Harpaz R, Baughman AL, et al.** Evaluation of laboratory methods for diagnosis of varisella. *Clin Infect Dis* 2010; 51:23-32.
9. **Stránská R, Schuurman R, Vos M, Van Loon AM.** Routine use of a highly automated and internally controlled real-time PCR assay for the diagnosis of herpes simplex and varisella-zoster virus infections. *J Clin Virol* 2004; 30:39-44. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.08.006
10. **Sauerbrei A.** Diagnosis, antiviral therapy, and prophylaxis of varisella-zoster virus infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35:723-34. https://doi.org/10.1007/s10096-016-2605-0
11. **Sauerbrei A.** Varisella-zoster virus infections during pregnancy. In: Mushahwar K (ed) Congenital and other related infectious diseases of the newborn. Perspectives in Medical Virology, vol 13. Elsevier, Amsterdam, 2007; 51-73.
12. **Weinmann S, Chun C, Mullooly JP, et al.** Laboratory diagnosis and characteristics of breakthrough varisella in children. *J Infect Dis* 2008; 197(Suppl 2):S132-8.
13. **Kneitz RH, Schubert J, Tollmann F, Zens W, Hedman K, Weissbrich B.** A new method for determination of varisella-zoster virüs immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis* 2004; 4:33. https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-33
14. **Lope A, Schmid S, Stephanie Bialek S.** VPD Surveillance Manual, CDC Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases, 5th Ed., 2011.
15. **Köse Ü, ÖzgÜven AA, Ecemiş T, Akçalı S, Lağarlı T, Onağ A.** Manisa ilinde yaşayan 7-15 yaş grubundaki çocuklarda suçiçeği seroprevalansı. *Ege Tıp Derg* 2011; 50:187-91.
16. **Dilli D, Dallar Y, Önde U, Doğan F, Yağcı S.** Ergenlerde kızamık, kızamıkçık, kabakulak ve suçiçeği seroprevalansı. *Çocuk Derg* 2008; 8:172-8.
17. **Türkmen M, Buğdaycı R, Sönmez M.** 0-12 yaş çocuklarda suçiçeği enfeksiyonu geçirme sıklığı. *Çukurova Univ Tıp Fak Derg* 2001; 26:137-41.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):190-196, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.190

Araştırma

Acinetobacter spp. Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Epidemiyolojisi

Murat TELLİ*, Mete EYİGÖR, Berna KORKMAZGİL*, Neriman AYDIN*, Mustafa Altay ATALAY*****

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

***Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya*

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

ÖZ

Amaç: *Acinetobacter baumannii çoklu antimikrobiyal direnç gösterebilen ve hastaneden kazanılmış enfeksiyonlarda önemi olanbir patojendir. Çoklu ilaca dirençli A. baumannii suşlarının tedavisinde karbapenemler seçenektir. Çalışmamızda, karbapenem dirençli A. baumannii suşlarında direnç mekanizmalarının ve moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmamızdaki 122 Acinetobacter spp. kökeninin tanımlanmasında tam otomatik tanımlama kitleri kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları CLSI Klavuzuna göre test edilmiş ve yorumlanmıştır. Bu suşlarda, OXA-23 grup, OXA-24 grup OXA-51 grup, OXA-58 grup oksasilinaz genleri ve IMP, VIM, GIM, SPM, SIM, NDM-1 metallo-betalaktamaz genleri PZR ile araştırılmıştır. Klonal dağılımı PFGE ile araştırılmıştır.*

Bulgular: *Karbapenem dirençli 42 suş bulunmuştur. ARDRA deneyi ile 41 tanesi A. baumannii, bir tanesi Acinetobacter sp. olarak tanımlanmıştır. Bu suşların tamamı sefaperazon/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, seftazidime dirençli, %95'i siprofloksasine, %86'sı amikasine, %21'i tigesikline, %12'si polimiksine dirençli, kolistine dirençli suş bulunmamıştır. Suşların 30'u bir klona ait (A) bulunmuştur. Karbapenem dirençli suşlardan 18'i (%78) OXA-23 grup, 5'i (%12) OXA-58 grup direnç geni pozitif bulunurken OXA-24 grup direnç genine sahip suş bulunmamıştır. Yirmi üç (%54) suşta yalnızca OXA-51 grup pozitif bulunmuştur. Dört suşta, OXA-23 ve OXA-58 direnç geni beraber bulunmuştur. Karbapenemaz enzimlerinden IMP, VIM, GIM, SPM, SIM genleri bulunmaz iken, A. baumannii dışı bir suşta NDM-1 direnç geni bulunmuştur.*

Sonuç: *Acinetobacter spp. suşları bir suş dışında A. baumannii bulunmuştur. Karbapenem direnç oranı %34 bulunmuştur. Karbapenem direncinden en çok oksasilinaz tipi enzimler sorumlu (en sık OXA-51 grup) bulunmuştur. Otuz suşun bir klona ait olması, direnç yayılımında belli bir hastane klonunun sorumlu olduğu gösterilmiştir. Yalnızca A. baumannii dışı bir suşta NDM-1 direnç geni bulunmuştur, diğer metallo-beta laktamaz direnç enzimleri bulunmamıştır.*

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii, karbapenem direnç, epidemiyoloji*

ABSTRACT

Molecular Epidemiology of Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of Acinetobacter spp

Objective: *Acinetobacter baumannii can develop multi-drug resistance and is an important pathogen in hospital-acquired infections. Carbapenems are the choice of treatment for A. baumannii strains resistant to multidrug therapy. The aim of this study is to detect carbapenem resistance mechanisms detected in A. baumannii strains, and to investigate molecular epidemiology of this resistance.*

Material and Methods: *We investigated 122 Acinetobacter spp. strains and identified with fully automated identification system. Antimicrobial susceptibilities were tested and interpreted according to the CLSI guidelines. In these strains, metallo-beta-lactamase genes (IMP, VIM, GIM, SPM, SIM, NDM-1) and oxacillinase genes (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58) were investigated with PCR. Clonal distribution was investigated with PFGE.*

Results: *We obtained forty-two carbapenem resistant isolates. Using ARDRA assay 41 of these strains were identified as A. baumannii and one as Acinetobacter spp. All carbapenem resistant isolates were also resistant to cefoperazone/sulbactam, piperacillin/tazobactam and ceftazidime. Other resistance rates were 95% to ciprofloxacin, 86% to amikacin, 21% to tigecycline and 12% to polymyxin. None of the isolates were resistant to colistin. Thirty isolates were found to belong to a unique clone (A). Of the carbapenem resistant isolates 18 (78%) were OXA-23 group and 5 (12%) were OXA-58 group resistance gene positive. OXA-24 group of resistance genes was not observed in any of the isolates. Of the carbapenem resistant isolates 23 (54%) harboured only OXA-51 genes. Both OXA-23 and OXA-58 genes were observed in four isolates. Other karbapenemase genes IMP; VIM, GIM, SPM, SIM, were not detected in any of the isolates while NDM-1 was positive in only one that was non-A. baumannii.*

Conclusion: *In conclusion, carbapenem resistance rate was 34% and all Acinebacter spp. strains were A. baumannii except one. Oxacillinase group of enzymes were found to be more responsible (most frequent OXA-51) from carbapenem resistance. Thirty strains belonged to a unique clone and this hospital clone was considered to be responsible for the spread of resistance. NDM-1 resistance gene and other metallo-beta-lactamase genes were not found in these strains.*

Keywords: *Acinetobacter baumannii, carbapenem, resistance, epidemiology*

Alındığı tarih: 17.05.2017
Kabul tarihi: 22.08.2017
Yazışma adresi: Murat Telli, Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı 09010 Aydın
Tel: (0256) 444 12 56 / 2726
e-posta: mutelli@hotmail.com

GİRİŞ

Acinetobacter türleri nonfermantatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlarda ikinci sıklıkta izole edilmektedir. İnsanda en sık izole edilen tür *Acinetobacter baumannii*'dir. Bu mikroorganizma; antimikrobiyallere çoğul direnç kazanma ve çevresel yüzeylerde yüksek oranda canlılığını sürdürebilme yeteneği ile hastane ortamında kolayca kolonize olmakta ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere hastane enfeksiyonlarına yol açmaktadır[1,2].

Çoklu ilaca dirençli suşların tedavisi, geniş spektrumlu beta-laktamlara, aminoglikozidlere, fluorokinolonlara dirençli oldukları için zordur. Bu durum tedavide karbapenemlerin sık kullanılmasına neden olmuştur. Günümüzde karbapenem direnci tüm dünyada giderek artan oranlarda bildirilmekte ve önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır[3,4]. *Acinetobacter* türlerinde karbapenemlere direnç; beta-laktamaz üretimi, dış membran porin (omp) kaybı, efflux pompası ve penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik gibi çeşitli mekanizmalar ile olmaktadır[5]. *A. baumannii*'de karbapenemlere dirençtensorumlu en yaygın beta-laktamaz tipi kazanılmış oksasilinazlardan, *OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58* ve *OXA-143* enzimleri olan serin beta-laktamazlardır. Ayrıca *OXA-51* tipi doğal oksasilinazın aşırı üretimi ve diğer *OXA* enzimleriyle birlikteliği de yüksek düzey karbapenem direncine neden olmaktadır[6,7]. Bu çalışmada, karbapenemlere dirençli *Acinetobacter* spp. suşlarının belirlenerek, dirence en sık neden olan mekanizma/ enzimin ve klonal ilişkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri: Ocak 2007 ile Eylül 2010 tarihleri arasında hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* spp. olarak tanımlanmış 122 suş çalışmaya dâhil edilmiş ve karbapenem dirençli suşlar araştırılmıştır. Bakteri tanımlanması Phoenix 100 BD (BD Diagnostic, ABD) otomatize sistemi ve/veya Amplified ribosomal DNA restriction analizi (ARDRA) ile yapıldı. Çalışmaya aynı hastadan izole edilen suşlardan yalnızca biri tahlil edilmiştir.

Tüm bakterilerin, imipenem (IMP), meropenem (MEM), sefaperazon/sulbaktam (SCP), piperasilin/tazobaktam (TZP), seftazidim (CAZ), siprofloksasin (CIP), amikasin (AM), gentamisin (GN), duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre test edildi ve yorumlandı[12]. Karbapenem dirençli kökenlerde imipenem, meropenem, tigesiklin, sefoperazon/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, amikasin, polimiksin B, kolistin, seftazidim ve siprofloksasin minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) E-test yöntemi (Biomeriux, Fransa) ile üretici firma önerileri doğrultusunda uygulandı ve CLSI kılavuzuna göre yorumlandı[12]. CLSI kılavuzunda sınır değerleri olmaması nedeniyle SCP duyarlılık sınır değerleri <=16, 32, >=64 mg/L[13] olarak ve TG sınır değerleri ise ilaç üreticisi firmanın prospektüs bildirimlerine göre <=2, 4, >=8 mg/L (Wyeth AŞ, İstanbul) olarak alındı. Kontrol suşu olarak *A. baumannii* ATCC 19606 suşu kullanıldı.

Moleküler Yöntemler

Amplified ribosomal DNA restriction analizi (ARDRA): Karbapenem dirençli suşların genotipik tür ayrımı için ARDRA deneyi yapıldı. DNA eldesi için, bir gecelik koyun kanlı besiyerinde inkübe edilmiş suşlardan bir öze dolusu bakteri 500 μL steril distile su içinde süspanse edildikten sonra 95°C'de 15 dakika tutulduktan sonra 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Üsteki sıvı bu test ve daha sonraki testlerde polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) hedef DNA

araştırılması için kullanıldı. Daha sonra 16S rRNA ait gen spesifik dizileri kullanılarak (Forward-TGGCTCAGATTGAACGCTG GCGGC, Reverse- TACCTTGTTACG ACTTCA CCCCA) PCR yapıldı. Çoğaltılan gen bölgesi Alu I (AGCT), Cfo I (GCGC), Mbo I (GATC), Msp I (CCGG), Rsa I (GTAC) DNA kesim enzimleri ile kesildi ve oluşan bantlar görüntülendi. Bant paternleri gözle değerlendirilerek genomik tür ayrımı yapıldı[8].

Karbapenem Direnç Mekanizmalarının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması: Karbapenem direncine neden olan oksasilinaz genlerinden *OXA-23* grup, *OXA-24* grup, *OXA-51* grup, OXA-58 grup ve metallo-betalaktamaz genleri *IPM, VIM, GIM, SPM, SIM, NDM-1* ile *ISAba1* integronlarının varlığı bu enzimleri kodlayan gen bölgelerine ait spesifik primer dizileri kullanılarak *PCR* ile araştırıldı[9-11] (Tablo 1).

Tablo 1. Kullanılan primer dizileri [9-11].

Primer Adı	Gen Dizisi (5'-3')	Baz Büyüklüğü (bp)
OXA23-F	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501
OXA23-R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	
OXA24-F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246
OXA24-R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	
OXA51-F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353
OXA51-R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
OXA58-F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599
OXA58-R	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	
IMP F	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C	188
IMP-R	CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	
VIM- F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390
VIM-R	CGA ATG CGC AGC ACC AG	
GIM-1-F	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA	477
GIM-1-R	AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	
SPM-1- F	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG	271
SPM-1- R	ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	
SIM-1- F	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G	570
SIM-1- R	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	
NDM-1 F	CCA ATA TTA TGC ACC CGG TCG	794
NDM-1 R	ATG CGG GCC GTA TGA GTG ATT G	
ISAba1 F	CAC GAA TGC AGA AGT TG	-
ISAba1 R	CGA CGA ATA CTA TGA CAC	

Konjugasyon Deneyi

Direnç genlerinin plazmid aracılı transferinin araştırılması amacıyla konjugasyon deneyi yapıldı. Alıcı suş olarak *Escherichia coli* J53 (sodyum azid dirençli, 200 mg/L) suşu kullanıldı. Her iki alıcı ve verici suş logaritmik üreme fazı için 3 saat beyin-kalp infüzyonu buyyonda inkübe edildi. Alıcıdan 2.2 ml ile vericiden 0.2 ml karıştırılıp 1 saat inkübe edildi ve ardından selektif besiyerinde transkonjugatlar (200 mg/L sodyum azide, 4 mg/L imipenem) seçildi. Bu transkonjugatlardan plazmid DNA izolasyonu ticari kit kullanılarak üretici firmanın (GeneJET plasmid miniprep kit; Fermentas, İsveç) önerileri doğrultusunda yapıldı ve direnç genleri araştırıldı[14].

Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Karbapenem dirençli suşlardaki klonal ilişkinin ortaya çıkarılması için PFGE deneyi yapıldı. Bir gece koyun kanlı agarda inkübe edilmiş saf *A. baumannii* suşlarından, 1 ml hücre süspansiyon solüsyonunda (HSS; 100M Tris-HCL, 100mM EDTA, ph 8.0) 4 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bakteri süspansiyonu 13.000 rpm olacak şekilde 2 dakika süre ile santrifüjlendi. Üstteki sıvı atıldı ve pellet 1 ml HSS ile çözüldü. Bu solüsyonun 100 μl ile 5 μl proteinaz K (20 mg/ml stok) karıştırıldı. %1 sodyum dodesilsülfat içeren %2'lik "low melting" agarın 100 μl'si ile bu bakteri süspansiyonu karıştırıldı. Daha sonra bu karışım "plug-mold" kalıplarına dağıtıldı. Oluşan bakteri jel plakları 1 ml hücre lizis solüsyonu (HLS; %50 mM Tris, %50 mM EDTA, pH 8, %1 sarkozil) ve 3 μl proteinaz K (20 mg/mL stok) içeren sıvının içine kondu ve 2 saat 54°C'de inkübe edildi. Daha sonra 2 defa distile su ile 4 defa Tris-EDTA tampon sıvısı ile 50 °C'de yıkama işlemi yapıldı. Lizis sonunda açığa çıkan DNA, ApaI (30 ünite) enzimi ile kesildi. Kesilen DNA parçaları %1'lik agaroz jel içinde CHEF DRIII

(Bio-Rad Laboratories, Belçika) sisteminde 14 °C'de ve 6V/cm²'de 20 saat koşullarında yürütüldü. Oluşan bantlar 15 μl/ 200 ml "safeview" DNA boyayıcı içinde 40 dakika tutularak UV ışıkta görüntülendi. Bantlar arasındaki ilişki "Tenover kriterleri"ne göre gözle değerlendirildi[15,16].

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (TPF: 10030).

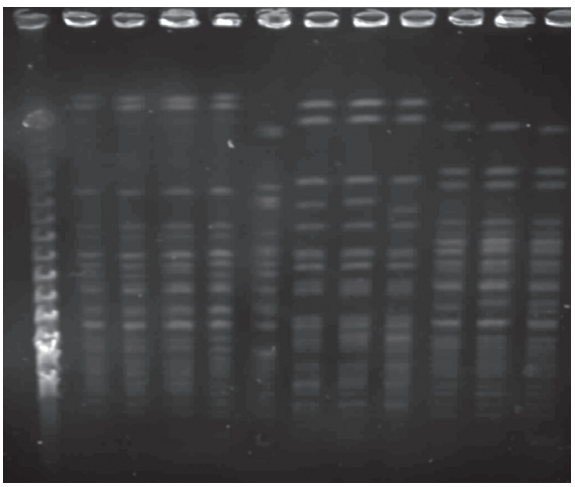
BULGULAR

Çalışmaya alınan 122 *A. baumannii* veya *A. baumannii/calcoaceticus* complex suşu otomatize sistemle tanımlanmıştır. Çalışmamızdaki suşların elde edildiği örneklerin dağılımı şöyleydi: 52'si (%42) solunum yolu, 32'si (%26) kan, 23'ü (%19) yara yeri, 8'i (%7) idrar ve yedisi (%6) diğer örneklerdir (göz, periton, plevra, kateter). Bu örneklerin 38'i (%31) dâhili bilimlere ait servislerinden, 33'ü (%27) cerrahi bilimlere ait servislerinden, 31'i (%26) pediatri servisinden ve 20'si (%16) yoğun bakım ünitelerinden gönderilmişti.

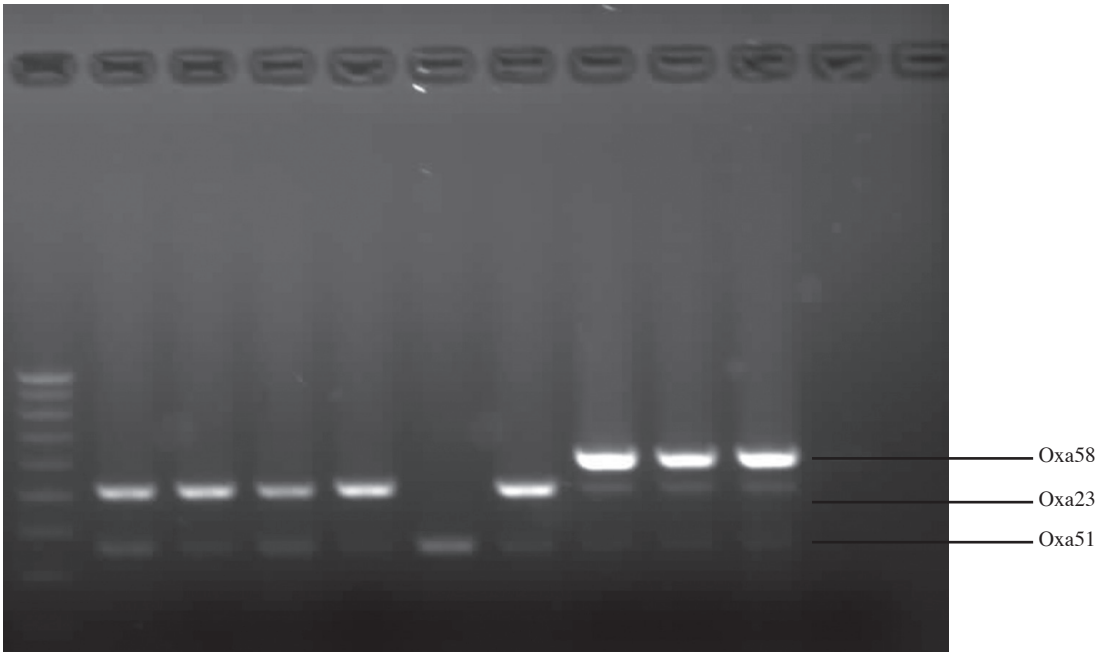
Çalışmaya dâhil edilen 122 suş disk difüzyonla, 42'si (%34) IMP ve MEM'e, 67'si (%55) SCP, 95'i (%78) CAZ, 94'ü (%77) GN, 91'i (%75) CIP, 91'i (75) TZP ve 61'i (%50) AM dirençli bulunmuştur. Karbapenemlere dirençli 42 suşun tamamı SCP, TZP ve CAZ'e dirençli, %95'i CIP, %86'sı AM, %21'i TG, %12'si PO dirençli iken, kolistine dirençli suş bulunmamıştır. Karbapenem dirençli suşların $MİK_{50/90}$ değerleri; imipenem >=64/>=64, meropenem >=64/>=64, piperasilin/tazobaktam >=512/>=512, polimiksin B 1/4, sefoperazon/sulbaktam 128/>=512, kolistin 0.5/2, tigesiklin 1/8, seftazidim >=512/>=512, siprofloksasin >=64/>=64 ve amikasin 128/>=512 olarak bulunmuştur.

Karbapenem dirençli suşların ARDRA yöntemiyle genotiplendirilmesi sonucu 41'i *A. baumannii*, bir suş *A. baumannii*-dışı tür olarak tanımlanmıştır. Karbapenem dirençli suşlarda birbirinden farklı 8 PFGE klonu (a1 subklonunda 30 suş, bunun a2 subklonunda 3 suş, b ve c klonlarında 3'er suş, d klonunda 2 suş, e, f, g, h klonlarında birer suş) bulunmuştur (Şekil 1). Karbapenem dirençli suşların 18'inde (%42) *OXA–23* grup, 5'inde (%12) *OXA-58* grup direnç geni pozitif bulunurken, *OXA-24* grup direnç genine sahip suş bulunmamıştır. Tüm *A. baumannii* suşlarında doğal olarak bulunan *OXA–51* grup direnç geni bulunmuştur. *OXA–51* direnç geni olan ve test ettiğimiz diğer direnç geni olmayan 23 suş bulunmuştur. Dört suşta *OXA–23, OXA-58* direnç geni birlikteliği saptanmıştır. Diğer karbapenemaz enzimlerinden *IMP, VIM, GIM, SPM, SIM* hiçbir suşta bulunmaz iken, *A. baumannii* dışı bir suşta *NDM–1* direnç geni bulunmuştur. *OXA–58* direnç genine sahip suşlar a2(3), f(1), g(1) klonlarına ait iken, *OXA–23* direnç genine sahip olanlar a1(9), b(2), c(3), d(2), e(1), h(1) klonlarına aittir. *NDM–1* direnç genine sahip suş g klonuna ait bulunmuştur. *OXA–23, OXA–53, OXA–51* grup pozitif suşlarda *ISAba1* geni ilişkisi araştırılmış ve hepsinde negatif bulunmuştur.

OXA–23 ve *OXA–51* ve *OXA–53* direnç geni pozitif suşlarda direnç geninin transfer edilebi-



Şekil 1. Seçili izolatlardan PFGE görüntüsü M; marker, A klonu; 77, 97, 127, 150, B klonu; 73, 128, 134, C klonu; 135, 143, 146, D klonu; 158



Şekil 2. Multipleks PCR reaksiyonu ile OXA pozitif seçili izolatların jel görüntüsü.

lirliliği konjugasyon deneyi ile araştırılmış ancak gösterilememiştir. Elde edilen plazmid DNA'da bu genler çoğaltılamamıştır.

TARTIŞMA

Acinetobacter türlerinde görülen çoklu ilaç direnci, *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde, karbapenemlerin yoğun olarak kullanımına neden olmakla birlikte, karbapenem direnci de giderek yaygınlaşmaktadır[7]. Günümüzde, bilinen tüm antibiyotik gruplarına dirençli *A. baumannii* suşları bildirilmektedir[3]. Çalışmamızda, *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direnci %34 oranında bulunmuştur. Anabilim Dalı'mızın içinde bulunduğu ulusal bir çalışmada, 2007 yılında *A. baumannii* suşlarında karbapenem direnci görülmez iken, çalışmamızda, karbapenem direnci %34 olarak bulunmuştur[17].

Çalışmamızda, 18 suşta *OXA-23* geni, beş suşta *OXA-58* geni ve dört suşta hem *OXA-23* hem de *OXA-58* geni bulunmuştur. *OXA-24* genine rastlanmamıştır. *Acinetobacter baumannii* suşlarında karbapenem direncinden sorumlu tutulan temel mekanizma *OXA* enzimleridir[18]. *OXA-23* enziminin daha çok İngiltere, Fransa, Brezilya ve Yunanistan'da, *OXA-24* enziminin İspanya'da, *OXA-58* enziminin ise Fransa, İspanya, İtalya, Yunanistan ve Avusturya'da daha sık görüldüğü bildirilmektedir[5]. Türkiye, Yunanistan ve İtalya'nın da aralarında bulunduğu Akdeniz ülkelerini içeren bir çalışmada, 1999-2009 yılları arasında karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatlarında en yaygın genin *OXA-58* olduğu 2009 yılından itibaren ise *OXA-23* geninin giderek artarak *OXA-58* geninin yerini almaya başladığı bildirilmiştir[19]. Sarı ve ark.[20], 62 karbepeneme dirençli *A. baumannii* izolatını incelediklerı çalışmalarında, tümünde *OXA-23* genini saptarken, hiçbirinde *OXA-58*-benzeri enzimleri kodlayan genler saptamamışlardır. *A. baumannii* suşlarında intrinsek olarak bulunan *OXA-51* direnç geninin fazla miktarda üretildiğinde karbapenem direncine katkıda bulunduğu ve *ISAba1* genetik elemanının *OXA-51* geninin önüne gelerek ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir[20,21]. Çalışmamızda, tüm suşlarda *OXA-51* benzeri enzimleri kodlayan genlerin varlığı belirlenmiş,

OXA-23 ve *OXA-58* direnç genine sahip suşlarda ISAba1 insertion sekans bölgesi ile ilişki bulunamamıştır. Direnç genlerinin hiçbiri konjugasyon deneyinde transfer edilememiştir bu da genlerin kromozomda yerleşik olduğunu düşündürmüştür.

Acinetobacter baumannii suşlarında metallo-beta-laktamaz (MBL) türü enzimler *OXA* tipi karbapenemazlardan daha az görülmesine rağmen, MBL'lerin karbapenemaz aktivitesi daha yüksektir[3,22]. IMP direnç geninin daha çok İtalya, Japonya, Güney Kore, Portekiz'de, *VIM* ve *SIM* direnç genlerinin ise daha çok Güney Kore'de görüldüğü bildirilmektedir[5,23]. Çalışmamızda, *IMP, VIM, GIM, SPM* ve *SIM* direnç genlerine rastlanmamış, bir *A. baumanni*-dışı. suşda *NDM-1* direnç geni bulunmuştur.

Çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* suşlarının epidemiyolojik olarak tanımlanması önemlidir. *A. baumannii*'ye bağlı salgınlarda genellikle bir baskın klonun epidemiyolojik olarak egemen olduğu bildirilmektedir[18,24]. Hastanelerde kolonize genotiplerin ciddi mortalite ve morbidite artışına neden olabileceği belirtilmektedir[25]. Karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının özellikle ventilatör ilişkili pnömoni tedavisinde mortalite artışına neden olduğu bildirilmektedir[26]. Çalışmamızda, karbapenem dirençli suşlar sekiz farklı genotipte bulunmuştur. Otuz suşu içeren A genotipini, ağırlıklı olarak pediatri servisinden gönderilen hasta örneklerinden izole edilen suşlar oluşturmaktadır. Bu suşların 2009 Ocak ayı ile 2010 Kasım aylarında kümelenmesi bir epideminin yaşanmış olduğunu düşündürmüştür. Genotip A, en çok solunum yolu örneklerinden (%18), daha sonra invazif örneklerden (%12) izole edilmiştir. Bu genotipin kolonize hastalardan izole edilebildiği gibi ciddi enfeksiyonlara da neden olabileceği görülmüştür. bla_{OXA-23} direnç geni 6 farklı genotipte (A, B, C, D, E, H) bulunmuştur. bla_{OXA-58} direnç geni ise 3 farklı genotipte (A, F, H) bulunmuştur. Her ikisine sahip suşlar iki farklı genotipte (A, H) bulunmuştur. Sadece bla_{OXA-58} geni sahip suşlar 3 farklı genotipte bulunmuş, ancak bunların %91'i (21 suş) genotip A'ya ait iken diğer B ve G genotiplerinde birer suş bulunmuştur. G genotipi *NDM-1* direnç genini içeren tek suşa ait bir genotip olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda, *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direnci %34 oranında bulunmuştur. Bu dirençten *OXA* tipi direnç enzimleri bunlardan da en çok *OXA-51* grup sorumlu bulunmuştur. *NDM-1* direnç genine sahip *A. baumannii* dışı bir suşta tek bir klona ait olarak bulunmuştur. Klonal dağılım olarak da 8 farklı genotip bulunmuş ve bunların içinde 30 suş tek bir klonda toplanmıştır. Bu bize hastanemizde bir nozokomiyal suşun bulunduğu ve özellikle pediatri servisinde belirli bir zaman aralığında epideminin olduğunu göstermiştir. Ayrıca dirençten sorumlu genlerin direnç oluşturmasında, *ISAba1* dışında bir *insertion* dizisinin sorumlu olabileceği ve daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. **Chagas TP, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef AP, Asesnsi MD.** Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79:468-72. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.006
2. **Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG.** *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Yolken RH eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003:749-79.
3. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:538-82. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07
4. **Wang H, Guo P, Sun H, et al.** Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:4022-8. https://doi.org/10.1128/AAC.01259-06
5. **Poirel L, Nordmann P.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and

epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:826-36. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x

6. **Pasanen T, Koskela S, Mero S, et al.** Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. *PLoS One* 2014; 9:e85854.
7. **Keyik S, Arslan U, Türk Dağı H, Seyhan T, Fındık D.** Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında OXA tipi beta-laktamazların araştırılması ve PFGE ile genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:556-65. https://doi.org/10.5578/mb.8274
8. **Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, et al.** Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:11-5.
9. **Park YS, Lee H, Lee KS, et al.** Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases-a multicentre study. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36:430-5. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.049
10. **Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, et al.** Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:321-2. https://doi.org/10.1093/jac/dkl481
11. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:351-3. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004
12. **CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th ed. CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
13. **Bradford PA, Sanders CC.** Use of a predictor panel for development of a new disk for diffusion tests with cefoperazone-sulbactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:394-400. https://doi.org/10.1128/AAC.36.2.394
14. **Potron A, Poirel L, Nordmann P.** Plasmid-mediated transfer of the blaNDM-1 gene in Gram-negative rods. *FEMS Microbiol Lett* 2011; 324:111-6. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02392.x
15. **Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G.** Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1816-9.
16. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.
17. **Gur D, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M.** Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (*OXA-23* and *OXA-58*)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. *J Med Microbiol* 2008; 57:1529-32. https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002469-0
18. **Park S, Kim HS, Lee KM, et al.** Molecular and epidemiological characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in non-tertiary Korean hospitals. *Yonsei Med J* 2013; 54:177-82. https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.1.177
19. **Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, et al.** Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill* 2012; 17:20117.
20. **Sarı B, Baran I, Alaçam S, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Aksu N.** Nozokomiyal çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında oksasilinaz genlerinin multipleks PCR ile araştırılması ve klonal ilişkilerinin rep-PCR ile değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:249-58. https://doi.org/10.5578/mb.8884
21. **Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL.** Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2974-6. https://doi.org/10.1128/JCM.01021-06
22. **Türk Dağı H, Kuş H, Keyik Ş, Arslan U, Tucer İ, Fındık D.** Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. *Ankem Derg* 2012; 26:187-92.
23. **Mezzatesta ML, D'Andrea MM, Migliavacca R, et al.** Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:160-6. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03527.x
24. **Cicek AC, Karagoz A, Koksal E, et al.** A single clone *Acinetobacter baumannii* outbreak in a state hospital in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2013; 66:245-8. https://doi.org/10.7883/yoken.66.245
25. **Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, et al.** Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:481-9. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01675.x
26. **Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J.** Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med* 2003; 31:2478-82. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000089936.09573.F3

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):197-204, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.197

Araştırma

Mersin İlindeki Akciğer Dışı Tüberküloz Olgularının Mikrobiyolojik ve Demografik Olarak Değerlendirilmesi*

Gönül ASLAN*, Mahmut ÜLGER, Nuran DELİALİOĞLU*, Zehra Feza OTAĞ*, Duygu DÜŞMEZ APA***, Gülden ERSÖZ****, Oğuz KÖKSEL*****, Erdal DORUK******, Necdet KUYUCU*******, Cengiz ÖZCAN********, Gürol EMEKDAŞ*********

**Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.*

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

****Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Mersin.*

*****Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin.*

******Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Mersin.*

******* Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Mersin*

******** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin*

*********Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak-Burun-Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin*

**********Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

ÖZ

Amaç: *Mycobacterium tuberculosis, çeşitli doku ve organlara yerleşerek hastalık oluşturmakta, akciğer dışında yerleşen tüberküloz (TB) akciğer dışı tüberküloz (ADTB) olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmada bölgemizdeki kültür pozitifliği ile doğrulanmış ADTB olgularımızın organ ve doku yerleşimleri açısından dağılım ve demografik özelliklerinin incelenmesi ile tanıda kullanılan yöntemlerin tanısal performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden ADTB şüpheli 2230 hastadan gönderilen klinik örnekler rutin işleme alındı. Ehrlich-Ziehl Neelsen boyama yöntemi ve kültür yöntemi ile Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTC) yönünden değerlendirildi. Kültüründe MTC üremesi belirlenen hastalar retrospektif olarak değerlendirildi.*

Bulgular: *ADTB şüpheli 2230 hastanın 101 (%4.5)'inde kültür yöntemleri ile MTC üremesi, 25 (%1.1)'inde aside dirençli basil pozitifliği belirlendi. Lenf bezi biyopsisi yapılan 35 (%34.7) hastanın 24 (%68.6)'ünde kazeifikasyon nekrozu saptandı. ADTB sıklığı tutulum yerlerine göre sınıflandırıldığında TB lenfadenit %34,7, genito-üriner sistem TB'si %19.8, TB plörezi %18.8, kemik-eklem TB'si %12.9, TB menenjit %10.9, periton TB'si %2 ve %1 gastrointestinal sistem TB olarak belirlendi.*

Sonuç: *Bölgemizde kültür pozitifliği ile doğrulanan ADTB görülme sıklığı %4.5 olarak bulundu. Olguların en üretken yaşlarda görülmesi ülkemizin ekonomik kaybının boyutlarını göstermesi açısından önemlidir. ADTB tanısındaki gecikmeler tedavide sorunlara yol açmakta bu ise mortalite ve morbiditenin artmasına neden olmaktadır.*

Anahtar kelimeler: *Akciğer dışı tüberküloz, tanı, mikroskobik inceleme, kültür*

ABSTRACT

Microbiologic and Demographic Evaluation of Extrapulmonary Tuberculosis Cases in Mersin Province

Objective: *Mycobacterium tuberculosis causes disease by settling in various tissues and organs; and tuberculosis (TB) that has settled out of the lungs is called extrapulmonary tuberculosis (EPTB). In this study, we aimed to investigate the demographic features and distribution of organ and tissue localization of EPTB cases in our region which are all confirmed by culture positivity; and the comparison of diagnostic performance of the diagnostic methods.*

Material and Methods: *Clinical specimens of 2230 patients sent from various clinics, suspected of EPTB, were examined in the Department of Mycobacteriology. The presence of Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) was evaluated by Ehrlich-Ziehl Neelsen and culture methods. Patients whose cultures demonstrated growth of MTC were evaluated retrospectively.*

Results: *Of the 2230 patients suspected of EPTB, MTC was isolated from cultures of 101 (4.5%) patients, and in 25 (1.1%) of them growth of acid-resistant bacilli was detected. Caseation necrosis was detected in 24 (68.6%) of 35 (34.7%) patients that had lymph node biopsy. The frequency of EPTB classified according to the sites of infection were as follows: TB lymphadenitis (34.7%), genitourinary system TB (19.8%), pleural TB (18.8%), bone and/or joint TB (12.9%), TB meningitis (10.9%), peritoneal TB (2%) and gastrointestinal system TB (1%).*

Conclusion: *The frequency of EPTB confirmed with culture positivity was found to be 4.5% in our region. Observation of the cases during the most productive age is important to show the extent of economic loss of our country. Delays in the diagnosis of EPTB cause problems in treatment of the disease with an increase in the mortality and morbidity.*

Keywords: *Extrapulmonary tuberculosis, diagnosis, microscopic examination, culture*

Alındığı tarih: 15.02.2017
Kabul tarihi: 11.09.2017
Yazışma adresi: Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
e-posta: drgaslan@gmail.com

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Myocbacterium tuberculosis*'in neden olduğu dünya çapındaki en önemli bulaşıcı hastalıklardan biridir. TB, HIV'den sonra dünya genelinde enfeksiyon hastalıklara bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2016 Küresel TB raporuna göre dünya genelinde yaklaşık 10.4 milyon yeni TB hastası vardır ve yaklaşık 1.4 milyon kişi bu hastalıktan dolayı ölmektedir[1].

Tüberküloz her doku ve organı tutabilen çok geniş spektruma sahip bir hastalıktır. Akciğer dışında yerleşen çeşitli doku ve organ TB'ları akciğer dışı tüberküloz (ADTB) adı altında toplanır[2]. Ülkelerin demografik ve gelişmişlik düzeylerine göre TB olgularının yaklaşık %80'i akciğer, %20'si ADTB'dur. Ülkemizde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2015 yılında hazırladığı rapora göre 2013 yılında 4754 (%35.4) ADTB olgusu olduğu bildirilmektedir[3]. ADTB, birincil enfeksiyondan yıllar sonra ortaya çıkabildiği gibi, hızla ilerleyerek akut bir klinik tablo da oluşturabilir. Lenf nodları, plevra, genitoüriner sistem, kemik ve eklemler, miliyer, santral sinir sistemi (SSS), periton tutulumu başta olmak üzere tüm organları tutabilir. Tanısal güçlükleri nedeniyle yıllarca gözden kaçabilen ADTB hastalarındaki sıklık, son yıllarda tanı yöntemlerindeki gelişmelere bağlı olarak artış göstermektedir. TB hastalığın böbrek yetmezliği, diyabet, siroz, kazanılmış immün yetmezlik sendromu (Acquired Immun Deficiency Syndrome-AIDS) gibi bağışıklık yetmezliği durumlarında daha sık ortaya çıkması da bu artışın nedeni olarak gösterilmektedir[4,5].

Bu çalışmada, Ocak 2005-Aralık 2010 tarihleri arasında bölgemizdeki kültür pozitifliği doğrulanmış ADTB olgularımızın organ ve doku yerleşimleri açısından dağılım ve demografik özelliklerinin incelenmesi ve tanıda kullanılan yöntemlerin tanısal performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ocak 2005-Aralık 2010 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden ADTB şüpheli 2230 hastadan gönderilen toplam 3280 klinik örnek (periton sıvısı, plevra sıvısı, beyin omurilik sıvısı [BOS] ve diğer steril vücut sıvıları [SVS] ile lenf nodu, yara, abse, doku ve biyopsi örnekleri ile idrar ve diğer örnekler) rutin işleme alındı. Tüm örnekler Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) tarafından önerilen N-asetil-L-sistein (NALC)-NaOH yöntemiyle homojenize ve dekontamine edilip Ehrlich-Ziehl Neelsen (EZN), kültür yöntemleri Löwenstein-Jensen (LJ) ve sıvı otomatize sistemler (BACTEC-460 ve/veya MGIT 960) ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) yönünden değerlendirildi. Kültüründe MTC izole edilen hastalar ADTB'lu olarak değerlendirildi ve çalışma grubumuza dâhil edildi. Hastaların birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı duyarlılıkları sıvı otomatize sistemler ile belirlendi. Bu hastaların dosyaları da incelenerek demografik özellikler (yaş, cinsiyet, yaşadıkları yer), önceden geçirilmiş TB öyküsü, aile içi temas, anti-TB ilaç kullanımı, histopatolojik bulguların varlığı, ADTB'ye eşlik eden diğer tıbbi sorunlar ve HIV seropozitifliği yönünden değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz: Bu çalışmada laboratuvarımıza ADTB şüphesi ile gönderilen klinik örneklerde mikobakteri varlığını belirlemede kullanılan EZN yönteminin kültür yöntemlerine göre duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri (PPD) ve negatif prediktif değeri (NPD) hesaplamaları yapıldı.

BULGULAR

Çalışmada, ADTB şüphesi ile klinik örneği gönderilen 2230 hastanın 101 (%4.5)'inin kültürü pozitif olarak belirlendi. Laboratuvarımıza klinik örneği gönderilen hastaların 25 (%1.1)'inde aside dirençli basil (ARB) belirlendi. ARB pozitifliği belirlenen hastaların 17 (%68)'sinin kültürü pozitif bulunurken, 8 (%32)'inin kültürlerinde üreme olmadı (Tablo 1). Hastalardan izole edilen izolatların 87 (%86.1)'sinin birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı duyarlı olduğu, 6 hastada izoniazid direnci, 2 hastada streptomisin direnci, 1 hastada rifampisin direnci ve 1 hastada etambutol direnci; 3 hastada ise streptomisin ve izoniazid direnci ve 1 hastada da rifampisin ve etambutol direnci belirlendi.

Çalışmada, incelenen kültür pozitif 101 hastanın 52 (%51.5)'si erkek, 49 (%48.5)'u kadın, yaş ortalaması 43.4 (1-97) olarak bulundu. Çalışmada, hastaların geçmişe yönelik sorgulamaları yapıldığında, 3 (%3) hastada önceden geçirilmiş TB, 9 (%8.9) hastada ise aile içi temas belirlendi. On dokuz (%18.8) hastada, altta yatan hastalık ya da kolaylaştırıcı etken (DM, kardiyovasküler hastalık, malignite), saptandı. Biyopsi yapılan 35 (%34.7) olguda histopatolojik inceleme ile granülamatöz özellikte lezyon belirlendi ve bu olguların 24 (%68.6)'ünde kazeifikasyon nekrozu saptandı. Hastalarımızın hiçbirinde HIV seropozitifliği saptanmadı (Tablo 2).

Akciğer dışı tüberküloz olgularının tutulum yerleri sıklık sırasına göre incelendiğinde 35 (%34.7) lenf bezi biyopsi, 20 (%19.8) idrar, 19 (%18.8) plevra sıvısı, 13 (%12.9) kemik-eklem dokusu, 11 (%10.9) BOS, iki (%2) periton sıvısı ve bir (%1) dışkı örneğinde MTC üremesi belirlendi (Tablo 3).

Tablo 2. Kültür pozitif saptanan 101 hastanın klinik özellikleri.

Klinik Veri	n	%
Önceden tüberküloz geçirme	3	3
Aile içi temas	9	8.9
Eşlik eden diğer hastalıklar (malignite/DM)	19	18.8
Histopatolojik tanı	35	34.7
Klinik bilgisine ulaşılamayan hasta	24	24.4

DM: Diabetes mellitus

Tablo 3. Akciğer dışı tüberküloz olgularının tutulum yerlerine göre dağılımı.

Klinik Örnek	n	%
Lenf bezi biyopsisi	35	34.7
İdrar	20	19.8
Plevra sıvısı	19	18.8
Kemik-eklem dokusu	13	12.9
Beyin omurilik sıvısı	11	10.9
Periton	2	2
Dışkı	1	1

DM: Diabetes mellitus

Tüberküloz lenfadenitli hastaların 18'i kadın, 17'si erkek ve yaş ortalamaları 46.2 idi. Bu hastaların yalnızca 24 (%68.6)'ünde histopatolojik inceleme ile kazeifikasyon nekrozu gösterildi. Kültür pozitif örneklerin yalnızca 9 (%25.7)'unda ARB pozitifliği saptandı. TB lenfadenitli hastaların 9 (%25.7)'u servikal, 23 (%65.7)'ü periferik iken, 3 (%8.6)'ünün batında yerleştiği saptanmıştır. On üç (%37.1) hasta, TB lenfadenit tanısıyla tedaviye alındı. Bu hastalardan 1'inin tedaviyi terk ettiği belirlendi. Diğer hastaların ise klinik izlemlerine ulaşılamadı. TB lenfadenitli hastaların 1'inde aile içi temas öyküsü

Tablo 1. Çalışmaya dâhil edilen 2230 hastanın kültür ve ARB sonuçları ile duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri.

		Kültür					
		Pozitif	Negatif	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
ARB	Pozitif	17	8	%16.8	%99.6	%68	%96.2
	Negatif	84	2121				

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer
ARB: Aside dirençli basil

bulundu. Hastaların birinin daha önce akciğer TB'u geçirdiği ve kronik böbrek yetmezliği olduğu, diğer 1 (%2.9) hastanın ise 2002 yılında TB lenfadenit tanısı ile tedaviye alındığı, fakat dördüncü aydan sonra tedavisini terk ettiği öğrenildi. TB lenfadenitli hastaların birinde akut myelositik lösemi, birinde malign neoplazm, birinde Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu ve ikisinde DM bulunduğu belirlendi.

Genito-üriner sistem TB'u olan hastaların 11'i kadın, dokuzu erkek, yaş ortalamaları 48.1 idi. Bu hastalarda kültür pozitifliği yanında ARB pozitifliği, 3 hastada belirlendi. Kültür pozitif bir hastanın malignite nedeni ile immünsüpresif tedavi aldığı, bir hastada kronik böbrek yetmezliği, bir hastada ise DM bulunduğu belirlendi.

Tüberküloz plörezi (TBP) olan hastaların 13'ü erkek, altısı kadın, yaş ortalamaları 46.9 idi. Hastaların 3'üne yapılan plevra biyopsisi sonucuna göre histopatolojik olarak kronik granülamatöz inflamasyon tanısı konuldu. TBP'li hastaların yalnızca 1'inde ARB pozitifliği bulunurken dört hastada eşlik eden bronş kanseri, mezotelyoma, meme kanseri ve kronik böbrek yetmezliği belirlenmiştir. Başka bir hastada ise geçirilmiş TB öyküsü ve kronik karaciğer hastalığı olduğu belirlendi. TBP'li 2 hastada aile içi TB'lu hasta ile temas öyküsü belirlendi.

Kemik-eklem TB'u saptanan 13 olgunun 8'i kadın, 5'i erkek ve yaş ortalamaları 36.2 idi. Bu hastaların 2'sinde psoas absesi, 2'sinde vertebra tutulumu olması nedeniyle paravertebral abse bulunmaktaydı. Kronik osteomyelit tanısı konulan bir hastanın operasyonda alınan kemik dokusu kültüründe MTC izole edildi. Bu hastaların yalnızca 2'sinde ARB pozitifliği, 3'ünün histopatolojik incelemesinde ise granülamatöz inflamasyon saptandı. Kemik-eklem TB'u saptanan hastaların 7'sine TB tanısı konulduğu ve tedavilerine başlanıldığı belirlendi.

Çalışmada bulunan 11 tüberküloz menenjit (TBM)'li hastanın 6'sı erkek, 5'i kadın ve yaş ortalamaları 25.1 idi. Yalnızca 2 hastada ARB pozitifliği gözlendi. TBM'li hastaların 1'inde aile içi temas öyküsü bulundu. TBM'li 2 hasta milier TB'den hayatını kaybetmiş, diğer hastalar ise tedaviye alınmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen periton TB'lu 2 hastanın 1'i 78 yaşında erkek, diğeri ise 54 yaşında kadın hastaydı. Bu hastaların ARB negatif olduğu, histopatolojik olarak tanı konmamış hastalar olduğu belirlendi.

Çalışmamızda iki yaşında bir erkek çocuk hastanın dışkı örneğinden *Mycobacterium bovis* izole edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik örneklerinden mikobakteri varlığını belirlemede kullanılan EZN yönteminin kültür yöntemine göre duyarlılığı %16.8, özgüllüğü %99.6, pozitif prediktif değeri %68 ve negatif prediktif değeri %96.2 olarak bulundu (Tablo 1).

TARTIŞMA

Akciğer dışı tüberküloz genellikle akciğerlerdeki TB basillerinin lenfohematojen yolla yayılması ile meydana gelmektedir. ADTB, en sık lenf bezleri, plevra ve osteoartiküler sistemde görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1963-1986 yılları arasında akciğer TB oranı azalırken, ADTB 1964'te %7.8'den 1986'da %17.5'e çıkmıştır. Bunun yanı sıra 1985 yılından itibaren AIDS'in yayılışına paralel olarak tüm TB formlarında artış görülmüştür[6,7]. Yine Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm TB olguları arasında ADTB oranı 1991'de %16 iken, 2001 yılında %20'ye çıkmıştır[8]. Ülkemizde DSÖ'nün 2016 yılına ait raporunda TB insidansı yüz binde 18 olup,ADTB formları, tüm TB olgularının yaklaşık olarak %36'sını oluşturmaktadır[1]. Ülkemizde ise 2013 yılında 4754 (%35.4) ADTB

olgusu olduğu bildirilmektedir[3]. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, ADTB görülme sıklığının %3.2-%25.9 arasında değiştiği belirtilmektedir[9-13]. Yaptığımız çalışmada ise çalışmaya dâhil edilen 2230 hastanın 101 (%4.5)'ine ADTB tanısı konulmuştur. Kültür pozitif 101 ADTB olgumuzun 17 (%16.8)'sinde ARB pozitifliği saptanmasına karşın, 35 (%34.7) olguda granülomatöz lezyon, bu hastaların 24 (%68.6)'ünde ise granülomatöz lezyona kazeifikasyon nekrozunun eşlik ettiği saptanmıştır.

Akciğer dışı tüberkülozun tanısı için alınacak olan klinik örnekler, erişilmesi kısmen daha güç bölgelerden alındığı ve bu örneklerdeki basil miktarı az olduğu için tanısal testlerin duyarlılığı düşüktür. Yayma mikroskobisinin duyarlılığı %0-40 arasında değişmekle birlikte, negatif yayma sonuçları TB varlığını dışlamamalıdır. Kültür yöntemlerinin duyarlılığının ise %30-80 arasında değiştiği belirtilmektedir[14]. Bizim çalışmamızda da, kültür yöntemine göre ARB pozitifliğinin duyarlılığı %16.8, özgüllüğü ise %99.6 olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tüberkülozun yaygın olduğu toplumlarda ADTB, genellikle çocuklarda ve genç erişkinlerde görülürken, yaygın olmadığı toplumlarda ileri yaşlarda, özellikle 30 yaş üzerinde görülmektedir[15]. HIV enfeksiyonu ile birlikte hem akciğer hem de ADTB olgularında artış olduğu bildirilmektedir[16,17]. Ülkemizde 2013 kayıtlara giren 13409 TB olgusundan 32'sinin HIV pozitif olduğunun belirtilmesine rağmen, ADTB olgularında HIV pozitifliği ile ilgili bir bilgi verilmemiştir[3]. Çalışmamızda hastalarımızın hiçbirinde HIV seropozitifliği saptanmamıştır.

Verem Savaşı 2015 Raporu'na[3] göre ülkemizde ADTB olguları en çok 25-34 yaş grubunda (%18.2) görülürken, ülkemizin çeşitli bölgelerinde yapılan araştırmalarda[13,18,19], ADTB olgularının yaş ortalamasının 33-42 yaş arasında olduğu bildirilmiş olup, çalışmamızda ise yaş ortalamasının diğer çalışmalara benzer olarak 43.4 olduğu belirlenmiştir. ADTB olgularının toplumumuzda en üretken yaşlarda görülmesi, ülkemizde önemli ekonomik kayba neden olmaktadır.

Tüberkülozdan şüphelenildiğinde hastanın önceden TB geçirme ve hasta veya aile içi yakın teması kesinlikle sorgulanmalıdır[18,20]. Yapılan farklı çalışmalarda, %26 ile %65.8 arasında TB'ye maruziyet bildirilmiştir[20]. Çalışmamızda, kültür pozitif 101 hastanın 12'sinde (%11.9) TB'lu hasta ile temas ve önceden TB geçirme öyküsü saptanmıştır. Çalışmada, hastalarımızın üçünde geçirilmiş TB öyküsü, dokuzunda ise aile içi temas öyküsü bulunmaktadır. Çalışmamızda, temas oranının düşük olmasının nedenleri olarak, hastalarımızın anemnezlerinin eksik alınması veya bu olguların hastalıklarını saklamalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. ADTB gelişiminde önceden TB geçirme ve aile içi temas dışında hastanın uzun süreli steroid kullanımı, alkolizm, kronik obstriktif akciğer hastalığı, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, malignite, immünsüpresyon gibi eşlik eden tıbbi sorunlarının olması, TB reaktivasyonuna yol açarak ADTB gelişimine neden olmaktadır. Bu birliktelik önceki çalışmalarda %6-66 oranında bildirilirken[18,20], çalışmamızda incelenen hastaların 19'una malignite eşlik etmekteydi.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda ADTB tiplerinin dağılımı, Tablo 4'te verilmiştir. TB lenfadenit ya primer TB döneminde ya da primer enfeksiyon döneminde lenfojen veya hematojen yolla lenf bezlerine yerleşen ve dormant basil olarak yaşamını sürdüren basillerin yıllar sonra immün sistemin zayıflaması ile çoğalarak hastalık oluşturması sonucu gelişmektedir[21]. TB lenfadenit, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ADTB'nin en sık görülen şekli olmaya devam etmektedir. TB prevalansının yüksek olduğu ülkelerde TB lenfadenit, daha çok çocuk ve gençlerde görü-

Tablo 4. Dünya Sağlık Örgütü ve ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda Akciğer dışı tüberküloz tiplerinin dağılımı.

	DSÖ[6]	Taşova ve ark.[18]	Hitit ve ark.[20]	Günal ve ark.[13]	Mevcut çalışma
TB lenfadenit (%)	30.9	28.6	9	9.7	34.7
TBP (%)	23	-	--	10.7	18.8
GÜS-TB (%)	11.9	4	--	27.2	19.8
Kemik-eklem TB (%)	9.8	11.2	20.9	10.7	12.9
Miliyer TB (%)	7.3	5.1	6	0.9	--
TBM (%)	4.6	48.9	53.7	19.4	10.9
TB Peritonit (%)	3.3	-	--	9.7	2
Diğer (%)	9.8	-	--	11.6	1

TB: Tüberküloz, TBP: Tüberküloz plörezi, GÜS-TB: Genitoüriner sistem tüberkülozu, TBM: Tüberküloz menenjit, DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

lürken düşük prevalanslı ülkelerde ise daha ileri yaşlarda, özellikle kadınlarda saptanmaktadır[22]. Hitit ve ark.'nın[20] yaptıkları çalışmada, hastaların %83.3'ünün kadın olduğu ve %83.3'ünde periferik lenfadenit saptandığı belirtilirken, Taşova ve ark.'nın[18] yaptıkları çalışmada, hastaların %64.3'ünün kadın olduğu ve %96.4'ünde periferik lenfadenit saptandığı rapor edilmiştir. TB lenfadenitli hastalarımızın 18 (%51.4)'inin kadın olduğu, 9'unun (%25.7) servikal, 23 (%65.7)'ünün periferik lenfadenitken 3'ünün (%8.6) ise batında yerleştiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, TB lenfadenit tanısı alan hastalarda akciğer tutulumunun %5-70 oranında geniş bir aralıkta olabileceği bildirilmiş, bu geniş aralığın çalışmaların yapıldığı merkezlerin özelliklerinden dolayı olabileceği vurgulanmıştır[23]. Çalışmamızda, iki (%5.7) olguda aynı anda akciğer TB'u bulunmaktaydı.

Genito-üriner sistem TB'si, dünya genelinde ADTB'un yaklaşık %20'sini oluşturur[24]. Genito-üriner sistem TB'u, özellikle 20-40 yaş arası genç erişkinlerde görülür ve ADTB olgularının %2.8'ini oluşturmaktadır[25]. Gelişmiş ülkelerde akciğer TB'si olan hastaların yalnızca %8-10'unda, gelişmekte olan ülkelerde ise %15-20'sinde genito-üriner sistem TB'si gelişmektedir[24]. Verem Savaşı 2015 Raporu'na[3] göre ülkemizde genito-üriner sistem TB olguları %4.4 oranında görülürken, ülkemizde yapılan çalışmalarda, ADTB hastalarının %1.8-%27.2 arasında değişen oranlarda genito-üriner sistem TB'si bildirilmiştir[9,10,12,13,26]. Çalışmamızda, 20 (%19.8) olguda genito-üriner sistem TB'si saptanmıştır. Bu olguların 27-68 yaş arasında oldukları gözlenmiştir.

Tüberküloz plörezi, TB olgularının yaklaşık %10'unu oluşturmakta ve eksuda nitelikli plevral sıvıların en önemli nedenleri arasında yer almaktadır[27]. TBP'nin, gelişmiş ülkelerde primer enfeksiyonun ileri yaşlara kayması nedeniyle daha ileri yaşlarda ortaya çıkmasına karşın ,ülkemizde yapılan çalışmalarda, en sık 30 yaşın altındakilerde görüldüğü bildirilmiştir[28]. TBP tanısında ARB incelemesi ve kültür pozitifliğinin duyarlılığı, %0-30 arasında değişmekte, örneklerin histopatolojik incelemesi, ARB bakısı ve kültürün birlikte kullanılması duyarlılığı %90'lara çıkarmaktadır[29]. Plevranın hem histolojik hem de mikrobiyolojik incelenmesi ile tanı oranı, %80-90'lara çıkabilmektedir[30].

Mihmanlı ve ark.'nın[31] 105 hastada yaptıkları çalışmada, hastaların yaş ortalaması 32.6, ARB pozitifliği %11.5 bildirilmiş, histopatolojik inceleme sonucunda, 81 hastanın %62.9'unda TB ile uyumlu histopatolojik bulgular elde edilmiştir. Çalışmamızda TBP tanısı konan 19 hastanın yaş ortalaması 46.9 olup, %5.3'inde ARB pozitifliği, histopatolojik inceleme ile %15.8'ünde TB ile uyumlu granülamatöz inflamasyon belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan çoğu çalışmada, plevral sıvıda basil görülme oranı düşük (%0-10.5), plevra biyopsisinin histopatolojik incelemesiyle tanı oranının daha yüksek (%62-96.5) olduğu bildirilmektedir[23].

Kemik-eklem TB'si herhangi bir kemik veya eklemi tutabilmektedir. Kemik-eklem TB'si olgularının %25-50'si, omurgada görülür. En sık alt torasik, ikinci sıklıkla lomber bölgede gelişir, %50'sinde paravertebral abse eşlik eder. Kemik-eklem TB'si her yaş grubunda görülebilir[20]. Taşova ve ark.[18] çalışmalarında, olguların %36.4'ünün kadın olduğunu ve yaş ortalamasının 35.4 olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, Hitit ve ark.[20] olguların %64.3'ünün kadın olduğunu ve yaş ortalamasının 48.7 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda olguların %61.5 (8/13)'i kadın, %38.5 (5/13)'i erkek ve olguların yaş ortalaması 36.2 idi. Kemik-eklem TB'li olgularımızda daha çok vertebra tutulumu gözlenmiş, aynı zamanda vertebra tutulumu olan 2 hastada da paravertebral abse görülmüştür. Kemik-eklem TB'sinde tanıda sinoviyal sıvıda ARB pozitiflik oranı %20'den daha az iken, kültürde etkeni izole etme oranı %80'dir[32]. Olgularımızda ise 2 olguda (%15.4) ARB pozitifliği saptanmıştır.

Tüberküloz menenjit, primer enfeksiyonun erken veya geç komplikasyonu olarak ya da kazeifiye TB odağının (Rich odağı) subaraknoit odağa açılması sonucu oluşmaktadır. TB prevalansının yüksek olduğu popülasyonlarda TBM, en sık 0-4 yaşlarında görülmesi ile akciğer ve akciğer dışı diğer TB formlarından farklılık gösterir. TB prevalansının daha düşük olduğu popülasyonlarda olguların çoğunu erişkinler oluşturur. Erişkin yaş grubunda her yaşta görülebilirse de en fazla 25-45 yaşlar arasında görülmektedir[4]. Çalışmamızda, TBM olgularının 5 (%45.5)'i çocuk olgulardı ve 1 (%9.1) olguda da aile içi temas öyküsü bulunmaktaydı. Diğer olgularımız ise erişkin yaş grubundaydı ve TBM'li tüm olgularımızın yaş ortalaması 25.1 idi.

Tüberküloz menenjit ile yapılan çeşitli çalışmalarda, ARB bakısı ile %10-40 oranında pozitiflik saptanabildiği, kültür pozitifliğinin ise %50'nin altında olduğu bildirilmiştir[18,33]. Çalışmamızda, kültür pozitif 11 TBM olgusundan yalnızca iki (%18.2)'sinde ARB pozitifliği saptanmıştır.

Tüberküloz menenjit, kafa travmasını takiben, gebelik veya alkolizm gibi vücut direncinin baskılandığı durumlarda da ortaya çıkabilmektedir[4]. TBM'den hayatını kaybeden bir olgumuzun 24 haftalık gebe olduğu saptandı.

Akciğer dışı tüberküloz tipleri içinde bulunan TB peritonit, en sık rastlanılan gastrointestinal TB tipidir. Hematojen ya da bağırsaktan doğrudan yayılımla oluşur. Genç erişkinlerde sık görülmekle birlikte, her yaşta olabilmekte ve peritondan yapılan biyopsi örneği, %65 oranında tanı koydurucudur[32]. Çalışmamızda, 78 yaşında bir erkek ile 54 yaşında bir kadın hastada TB peritonit saptanmıştır. Bir yaşında malnütrisyon, gelişme geriliği olan erkek hastanın dışkı kültüründen *M. bovis* saptanmıştır.

Sonuç olarak, ADTB, her geçen gün önemi ve yaygınlığı daha da artan ve ülkemiz için boyutları tam olarak bilinmeyen, önemli bir halk sağlığı sorunudur. ADTB, sinsi olarak seyretmekte ve klinikte ancak şüphe edilmesi durumunda tanı olasılığı artmaktadır. ADTB tanısındaki gecikmeler, tedavide sorunlara yol açmakta, bu ise mortalite ve morbiditenin artmasına neden olmaktadır. ADTB'u takip eden her kliniğin mikrobiyoloji laboratuvarı ile iletişim hâlinde olması güvenilir veriler elde edilmesi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. **World Health Organization.** Global tuberculosis report 2016. World Health Organization. 2016 [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1]. (Erişim tarihi: 05.01.2017)
2. **Sharma SK, Mohan A.** Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120:316-53.
3. TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Türkiye'de Verem Savaşı 2015 Raporu [http://tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/Dokumanlar/raporlar/turkiyede_verem_savasi_2015_raporu.pdf] (Erişim tarihi: 24.12.2016)
4. **Örmen B, Örmen M, Türker N ve ark.** Tüberküloz

menenjitte beyin-omurilik sıvısında adenozin deaminaz aktivitesi. *Infeks Derg* 2005; 19:407-13.

5. **Lowieke AM, van der Werf BM, Richter C, Borgdorff MW.** Extrapulmonary Tuberculosis by Nationality, the Netherlands, 1993-2001. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1375-82. https://doi.org/10.3201/eid1209.050553
6. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva, Switzerland. World Health Organization. 2002. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63835/13/WHO_CDS_TB_2002.295_eng.pdf]. (Erişim tarihi: 18.12.2016)
7. **Kocabaş A.** Akciğer tüberkülozu. In: Wilke TA, Söyletir G, Doğanay M, Eds. İnfeksiyon Hastalıkları. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996:396-443.
8. **Yang Z, Kong Y, Wilson F, et al.** Identification of risk factors for extra-pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis 2004; 38:199-205*. https://doi.org/10.1086/380644
9. **Demiralay R.** Isparta ili verem savaş dispanserlerinde kayıtlı akciğer dışı organ tüberkülozunun bazı epidemiyolojik özellikleri. *Tuberk Toraks* 2003; 51:33-9.
10. **Özkara Ş, Şipit T, Berktaş B, Özkul M.** Tüberkülozda ilaç direncinin epidemiyolojik özellikleri. *Solunum Hastalıkları* 1995; 6:223-32.
11. **Kalaç N, Başay N, Mutluay Nİ, Bayız H, Özkul M.** Ekstrapulmoner tutulum gösteren tüberküloz olguları. *Tuberk Toraks* 1999; 47:213-5.
12. **Tavusbay N, Aksel N, Çakan A, Gülerçe G, Dereli Ş, Özsöz A.** Ekstrapulmoner tüberkülozlu olgularımız. *Solunum Hastalıkları* 2000; 11:294-8.
13. **Gunal S, Yang Z, Agarwal M, Koroglu Z, Arıcı ZK, Durmaz R.** Demographic and microbial characteristics of extrapulmonary tuberculosis cases diagnosed in Malatya, Turkey, 2001-2007. *BMC Public Health* 2011; 11:154-61. https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-154
14. **Lee JY.** Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2015; 78:47-55. https://doi.org/10.4046/trd.2015.78.2.47
15. **Chan CHS, Arnold M, Chan CY, Mak TW, Hoheisel GB.** Clinical and pathological features of tuberculous pleural effusions and its long-term consequences. *Respiration* 1991; 58:171-5. https://doi.org/10.1159/000195921
16. **Lin JN, Lai CH, Chen YH, et al.** Risk factors for extra-pulmonary tuberculosis compared to pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:620-5.
17. **Noertjojo K, Tam CM, Chan SL, Chan-Yeung MM.** Extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis in Hong Kong. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:879-86.
18. **Taşova Y, Saltoğlu N, Mıdıklı D, Kandemir Ö, Aksu HSZ, Dündar IH.** Erişkinde 98 ekstrapulmoner tüberküloz olgusunun değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 2000; 13:17-23.
19. **Ertuğrul BM, Karaaslan T, Ertuğrul Ö.** On bir erişkin ekstrapulmoner tüberküloz olgusunun değerlendirilmesi. *Ankem Derg* 2005; 19:5-8.
20. **Hitit GÖ, Göktaş P, Erdem İ, Özyürek SÇ, Yüksel S.** Erişkinde 67 akciğer dışı tüberküloz olgusunun değerlendirilmesi. *Infeks Derg* 2005; 19:407-13.
21. **Tatar D, Güneş EY, Özacar R, Ermete S, Halilçolar H.** Lenf bezi tüberkülozu. *Solunum Hastalıkları* 2001; 12:207-11.
22. **Aslan G, Emekdaş G, Apa DD, ve ark.** Tüberküloz lenfadenit olgularından izole edilen mikobakterilerin identifiye edilmesi ve antitüberküloz duyarlılıkları, *Ankem Derg* 2007; 21:27-31.
23. **Öztop A, Ünsal İ, Özgü A, ve ark.** Doksan beş erişkin akciğer dışı tüberküloz olgusu. *Solunum Hastalıkları* 2004; 15:34-42.
24. **Oran D, Köksal D, Kocaman Y, Çapan N, Özkara Ş.** Bir göğüs hastalıkları hastanesinde üriner sistem tüberkülozu. *Solunum Hastalıkları* 2005; 16:71-9.
25. **Yılmaz A, Bayramgüler B, Akkaya E, Sarıbaş E, Karakurt Z, Baran R.** Tüberkülozlu hasta popülasyonunda üriner sistem tüberkülozu sıklığı. *Solunum Hastalıkları* 2001; 3:23-6.
26. **Aslan G, Doruk E, Emekdaş G, ve ark.** Konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile idrar örneklerinden *Mycobacterium tuberculosis* izolasyonu ve tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41:185-92.
27. **Porcel JM, Vives M.** Differentiating tuberculous from malignant pleural effusions: a scoring model. *Med Sci Monit* 2003; 9:175-80.
28. **Ak G, Alataş F, Metintaş M ve ark.** Tüberküloz plörezili olguların genel özellikleri. *Toraks Derg* 2002; 3:45-51.
29. **Golden MP, Vikram HR.** Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *Am Fam Physician* 2005; 72:1761-8.
30. **Deniz Ö.** Tüberküloz Plörezisi. *Gülhane Tıp Derg* 2005; 47:239-42.
31. **Mihmanlı A, Özşeker F, Ateş B, Küçüker F, Atik S, Akkaya E.** Tüberküloz plörezili 105 olgunun değerlendirilmesi. *Tuberk Toraks* 2004; 52:137-44.
32. **Haas DW, Prez RM.** *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1995:2213-43.
33. **Porkert MT, Sotir M, Parrott-Moore P, Blumberg HM.** *Tuberculous menengitis* at a large inner-city medical center. *Am J Med Sci* 1997; 313:325-31.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(4):205-212, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.205

Araştırma

Yenidoğan Dışı Menenjit Şüpheli Hastalarda Bakteriyel Menenjit Etkenlerinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması[§]

Mehmet YARPUZLU*, Gönül ASLAN, Mahmut ÜLGER***, Seda TEZCAN ÜLGER*, Gürol EMEKDAŞ****, Necdet KUYUCU*****, Ali KAYA******

**Mersin Halk Sağlığı Laboratuvarı, Mersin*

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

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

*****Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

******Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin*

*******Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin*

ÖZ

Amaç: *Pürülan menenjit olgularının büyük kısmından Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae ve Neisseria meningitidis sorumludur. Bu çalışmada, hastanemizde izole edilen yenidoğan dışı bakteriyel menenjit etkeni olan bu bakterilerin tanımlanması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmaya Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin çeşitli kliniklerinde yenidoğan dışı menenjit şüpheli 137 hastanın Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) örnekleri dâhil edildi. Örneklerin Gram boyamaları, hücre sayımı ve klasik kültürleri yapıldı. Kültürde üreyen suşların serotiplendirmeleri yapıldı. Bu bakteriyel etkenlerin hızlı tanısı için BOS örneklerine polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve Lateks Aglütinasyon Testi (LAT) uygulandı.*

Bulgular: *Hastaların 87 (%63.5)'si erkek ve 50 (%36,5)'si kadındı. Gram boyama ile BOS örneklerinde beş Gram pozitif diplokok saptandı. Örneklerin dördünde (%2.9) kültür pozitifliği (üçünde S. pneumoniae, birinde H. influenzae), 18 (%13.1)'inde PZR pozitifliği ve 17 (%12.4)'sinde LAT pozitifliği belirlendi. Bu üç yöntem ile bakteriyel menenjit tanı alan hasta sayısı 19 (%13.8) olarak belirlendi. S. pneumoniae suşlarının serotipleri 6A/B, 23F ve 8 olarak, H. influenzae suşunun serotipi ise tip b olarak belirlendi.*

Sonuç: *Bakteri izolasyonu ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi açısından kültür vazgeçilmez bir yöntem olsa da özellikle öncesinde antibiyotik kullanan hastalarda moleküler yöntemler ve LAT'ın kültürle beraber kullanılması bakteriyel menenjitin hızlı tanısında oldukça yararlı olacaktır.*

Anahtar kelimeler: *Akut bakteriyel menenjit, kültür, polimeraz zincir reaksiyonu, lateks aglütinasyon testi*

ABSTRACT

Investigation of Bacterial Meningitis Agents from Patients with Suspicion of Non-Neonatal Meningitis by Conventional and Molecular Methods

Objective: *In the most of purulent meningitis cases Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae and Neisseria meningitidis are responsible. In this study we aimed to identify our these non-neonatal bacterial meningitis agents isolated in our hospital.*

Material and Methods: *Cerebrospinal fluid (CSF) specimens of 137 suspected cases of non-neonatal meningitis from various clinics of Mersin University Health Research and Application Center were included in this study. CSF specimens were subjected to Gram staining, cell count and conventional cultures. Serotyping of the strains isolated from culture was done. For the rapid diagnosis of these bacterial agents polymerase chain reaction (PCR) and latex agglutination test (LAT) were performed with the CSF specimens.*

Results: *The study population consisted of 87 (63.5%) male, and 50 (36.5%) female patients. Five gram positive diplococci were detected by Gram strain from CSF specimens. Culture was positive in four (2.9%) specimens (S. pneumoniae in 3, and H. influenzae in 1), PCR was positive in 18 (13.1%) and LAT was positive in 17 (12.4%) specimens. With these three methods 19 (13.8%) patients were diagnosed as bacterial meningitis. Serotypes of S. pneumoniae isolates were identified as 6A/B, 23F and 8; and serotype of H. influenzae isolates as type b.*

Conclusion: *Though culture is indispensable for the bacterial isolation and determination of antibiotic sensitivity; however, usage of molecular methods and LAT with culture would be very useful for rapid diagnosis of bacterial meningitis especially in patients with prior antibiotic usage.*

Keywords: *Acute bacterial meningitis, culture, polymerase chain reaction, latex agglutination test*

Alındığı tarih: 17.02.2017
Kabul tarihi: 16.10.2017
Yazışma adresi: Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
e-posta: drgaslan@gmail.com
[§] Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda tıpta uzmanlık tezi olarak hazırlanmış ve Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından [Proje No: BAP-TF TTB (MY) 2010-4 TU] desteklenmiştir.

GİRİŞ

Menenjit, pia ve araknoid boşlukların enflamasyonudur[1]. Erken tanı ve etkin tedavi mortalite ve morbiditeyi önemli oranda düşürmektedir. Çok farklı etkenler leptomeningeal enflamasyona neden olabilmekle birlikte, gerek morbiditesi gerekse mortalitesi nedeni ile akla ilk gelmesi gereken etkenler bakterilerdir. Pürülan menenjit olgularının büyük kısmından *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria meningitidis* sorumludur[2]. Bakteriyel menenjit etkenleri coğrafik bölge ve yaşa göre değişebilmektedir[1]. Konjuge *H. influenzae* tip b (Hib) ve pnömokok aşılarının rutin aşı takvimine girdiği ülkelerde akut bakteriyel menenjitin epidemiyolojik profilinde büyük değişiklikler olmuştur[3].

Menenjitin klasik bulguları olan ateş, baş ağrısı, ense sertliği, mental değişiklikler, nöbetler ve kusma yetişkin hastaların yarısından fazlasında gözlenmekle beraber, özellikle yenidoğan, yaşlı ve immün yetmezlikli hastalarda nonspesifik belirtiler gözlenebilmektedir[4]. Bakteriyel menenjitte gözlenen en sık bulgu ateştir. Özellikle ateş öyküsü varlığında peteşiyel, purpurik döküntüleri olan hastalarda ilk düşünülmesi gereken tanı akut bakteriyel menenjittir[5].

Bakteriyel menenjit tanısında; lomber ponksiyonla alınan Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) örneğinin incelenmesi, etkenin izolasyonu ve antibiyotik duyarlılığı için gereklidir[1]. BOS'da toplam hücre sayımı ve hücre tipi diğer analiz sonuçları değerlendirilerek enflamasyonun tipi (viral, bakteriyel, vb.) hakkında fikir sahibi olunabilir[6]. Bakteriyel menenjitte Gram boyamanın duyarlılığı %50-90 arasında değişmekle birlikte, kültürün yapılamadığı durumlarda erken tedavi için oldukça yararlıdır. Kültür yöntemi, bakteriyel menenjit tanısında etkenin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesine ve uygun tedaviye olanak sağlamasından dolayı altın standarttır. Ancak antibiyotik kullanılmış hastalarda duyarlılığı düşmektedir[7]. Bakteriyel menenjitin etiyolojik tanısı bir saatten daha kısa sürede sonuçlanan Lateks Aglütinasyon Testi (LAT) ile mümkün olabilmektedir[8]. Bu test bakteriyel menenjitin hızlı tanısında %50-100 arasında değişen duyarlılığa sahiptir. Öncesinde antibiyotik kullanımından etkilenmediği için kültür ve Gram boyama sonucu negatif olan hastalarda kullanılabilmektedir[9]. Kültür genellikle 24-48 saat sonra sonuçlanabilmekle beraber, bazen bakteri yoğunluğunun azlığından dolayı üreme daha da uzayabilmektedir. Son zamanlarda bakteriyel menenjitin hızlı ve doğru tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tabanlı birçok test geliştirilmiştir[10]. Bakteriyel menenjitin hızlı tanısında kullanılan PZR özellikle antibiyotik tedavisinden dolayı kültürün duyarlılığının düştüğü durumlarda oldukça yararlıdır. Ancak PZR'nin kontaminasyondan etkilenmesi en büyük sorundur[11].

Bu çalışmada, hastanemizde yenidoğan dışı bakteriyel menenjit etkenlerinden *S. pneumoniae, H. influenzae* ve *N. meningitidis*'in klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu'nun 02.03.2011 tarih ve 2011/45 sayılı kararı ile Etik Kurul Onayını almıştır.

Çalışmaya, Mart 2011-Ocak 2013 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Yenidoğan Dışı kliniklerinden Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na bakteriyel menenjit şüphelisi ile gönderilen 137 BOS örneği dâhil edildi.

Steril tüp içerisine alınan BOS örnekleri laboratuvara ulaştığında hızlıca Gram boyama, hücre

sayımı ve kültürleri yapıldı. Hücre sayımında BOS'un bir milimetre küpündeki lökosit miktarı belirlendi. Gelen örneklerde BOS miktarı yeterli ise 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek konsantrasyon işlemi uygulandı. Üst kısım atıldıktan sonra tüpün dibinde kalan kısımdan Gram boyama, hücre sayımı ve bakteriyolojik kültür yapıldı. Hücre sayımı için Thoma lamı kullanıldı. Kültür için BOS örnekleri %5 koyun kanlı, çikolata ve Eozin Metilen Blue agara inoküle edildi. Örneklerin geri kalan kısmı moleküler analizlerde kullanılmak üzere steril ependorfa alınarak -80°C'de saklandı. Ekim yapılan petriler 24-48 saat süreyle 37°C'de hem aerob ortamda hem de %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi[12]. Üreme olan kültürlerdeki şüpheli koloniler klasik yöntemler [koloni morfolojisi, Gram boyama, oksidaz, X ve V faktör, katalaz, optokin (5 μg) duyarlılık, safrada erime testleri[13,14]] ile tanımlandı.

Kültürde üreyen *H. influenzae* suşlarının serotiplendirmesi "Antisera set" (Denka Seiken™, Japonya; Lot: 135086) kiti ile kapsüler polisakkarit antijenlerini araştırmak suretiyle, spesifik antiserumlar kullanılarak lam aglütinasyon yöntemiyle yapılırken, *S. pneumoniae* suşlarının serotiplendirmesi; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nda, bulaşıcı hastalıklar sürveyansı çalışması dâhilinde yapıldı. *S. pneumoniae* suşlarının penisilin duyarlılığının belirlenmesinde E-test yöntemi kullanıldı[15].

BOS örneklerinden lateks aglütinasyon testi "Slidex Meningite-Kit 5" (BioMérieux, Lyon, Fransa; Ref. 58 803) kiti ile çalışıldı. Bu kit *H. influenzae* tip b, *S. pneumoniae, N. meningitidis* A, *N. meningitidis* B/*Escherichia coli* K1, *N. meningitidis* C antijen ekstrelerini içermektedir.

Çalışmaya dâhil edilen BOS örneklerinden DNA ekstraksiyonu "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche 11 796 828 001)'i kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'ların amplifikasyonu için multipleks PCR prensibi ile çalışan "Speed-Oligo Bacterial Meningitis" (Vircell, İspanya; Ref: SPC003) kiti kullanıldı. Bu kit *S. pneumoniae* için lytA, *H. influenzae* için bexA ve *N. meningitidis* için ctrA genlerine spesifik oligonükleotidler içermektedir.

Çalışmada *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 33391 ve *N. meningitidis* ATCC 13077 grup B standart suşları kullanıldı.

BULGULAR

Menenjit şüpheli 137 hastanın 87 (%63.5)'si erkek ve 50 (%36.5)'si kadın hastadan oluşmaktadır. Hastaların yaşları bir ay-83 yaş aralığında olup yaş ortalamaları 18.4 olarak bulundu. Hastaların 79 (%57.7)'u çocuk yaş grubunda (bir ay-18 yaş) iken, 58 (%42.3)'i erişkin yaş grubunda (19-83 yaş) idi.

Çalışmaya dâhil edilen hastaların 18 (%94.7)'inde ateş, 15 (%78.9)'inde baş ağrısı, 15 (%78.9)'inde meninks irritasyon bulguları ve 12 (%63.2)'sinde bulantı-kusmanın olduğu belirlendi (Tablo 1). Hastaların beşinin BOS örneğinde Gram boyama ile etken mikroorganizma (beş Gram pozitif diplokok) saptandı. Kültür yöntemi ile örneklerin üçünde *S. pneumoniae*, birinde *H. influenzae* izole edildi. Bu izolatların dışında 7 (%5.1) koagülaz negatif stafilokok, 4 (%2.92) *Serratia marcescens*, 2 (%1.46) *Staphylococcus aureus*, 2 (%1.46) *Acinetobacter baumannii* ve 2 (%1.46) *Pseudomonas aeruginosa* izolatı kültürde üretilmiş, ancak bu oldular çalışmaya dâhil edilmemiştir.

Kültür pozitif dört hastanın üçünde, (3 Gram pozitif diplokok) Gram boyama ile de BOS'da etken mikroorganizma belirlenirken, kültürde üreyen bir *H. influenzae* suşu BOS'da Gram boyama ile belirlenemedi. Kültürde izole edilen *H. influenzae* suşunun serotipi tip b, *S. pneumoniae* suşlarının serotipleri ise 6A/B, 23F ve 8 olarak

Tablo 1. Hastalara ait demografik bulgular ve laboratuvar sonuçları.

Cinsiyet (n:19)	**Erkek/Kadın 12/7**	
Ortalama yaş (n:19)	9 ay-68 yaş ortalama: 23.9 Çocuk: 7 %36.8 Erişkin: 12 %63.2	
Klinik bulgu (n:19)	Ateş Baş ağrısı Meninks irritasyon bulguları Bulantı-kusma Antibiyotik kullanma öyküsü	18 olguda %94.7 15 olguda %78.9 15 olguda %78.9 12 olguda %63.2 13 olguda %68.4
Altta yatan hastalık	8 olguda %42.1	
Laboratuvar (n:19)	BOS/Kan glukoz değeri BOS protein BOS lökosit sayımı ortalama	<0.6, 15 olguda %78.9 >450 mg/L, 13 olguda %68.4 2169/mm^3 (17 olguda %89.5 PNL ağırlıklı)
	Gram boyama	5 olguda Gram pozitif diplokok
	Kültür	3 olguda *Streptococcus pneumoniae* Serotipler 6A/B, E-test MIK 0.50 μg/ml 23F, E-test MIK 1.50 μg/ml 8, E-test MIK 0.06 μg/ml 1 olguda *Haemophilus influenzae* Serotip b
	LAT	17 olguda pozitif 16 olguda *Streptococcus pneumoniae* 1 olguda *Haemophilus influenzae*
	PZR	18 olguda pozitif 16 olguda *Streptococcus pneumoniae* 2 olguda *Haemophilus influenzae*
Sonuç	16 olgu %84.2 tedavi ile şifa 2 olgu %10.5 nörolojik sekel 1 olgu %5.3 tedavinin ilk günü	

LAT: Lateks Aglütinasyon Testi, PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı, PNL: Polimorf Hüveli Lökosit

belirlendi. Serotip 6A/B ve 23F suşlarının penisilin E-test MİK değerleri sırasıyla 0.50 μg/ml ve 1.50 μg/ml dirençli olarak belirlenirken, serotip 8 suşunun MİK değeri 0.06 μg/ml duyarlı olarak belirlendi.

LAT ile 17 (%12.4) hastada bakteriyel menenjit etkeni belirlendi. Bu hastaların 16 (%11.7)'sı *S. pneumoniae*, 1'i (%0.7) *H. influenzae* olarak tanımlandı. PZR ile 18 (%13.1) hastanın sonucu bakteriyel menenjit; bunların 16 (%11.7)'sı *S. pneumoniae*, 2'si (%1.4) *H. influenzae* olarak tanımlandı. LAT ve PZR ile hiçbir hastada *N. meningitidis* saptanmadı.

Gram boyama, kültür, LAT ve PZR yöntemlerinden herhangi biri ile pozitif 19 hastaya bakteriyel menenjit tanısı konuldu. Üç hastada tüm yöntemlerle, iki hastada Gram boyama, LAT ve PZR yöntemleriyle, 11 hastada LAT ve PZR yöntemleriyle, bir hastada kültür ve PZR yöntemleriyle, bir hastada yalnızca LAT ile ve bir hastada da yalnızca PZR yöntemiyle pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Bakteriyel menenjit tanısı alan 19 hastanın Gram boyama, kültür, lateks aglütinasyon testi ve polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarının karşılaştırılması.

Gram boyama	Kültür	LAT	PZR	N
+	+	+	+	3
+	-	+	+	2
-	-	+	+	11
-	+	-	+	1
-	-	+	-	1
-	-	-	+	1
	Toplam			19

LAT: Lateks aglütinasyon testi, PZR:Polimeraz zincir reaksiyonu

Hastalara ait demografik bulgular ve laboratuvar sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, yenidoğan dışı bakteriyel menenjit etkenlerinin (*S. pneumoniae, H. influenzae, N. meningitidis*) hızlı ve doğru bir şekilde saptanması ve bölgemizdeki bu bakteriyel menenjit etkenlerinin epidemiyolojik verilerinin oluşturulması amaçlandı.

Menenjit genellikle ateş, baş ağrısı, bulantı, kusma, bilinç değişikliği ve ense sertliği yakınmaları ile başlamaktadır[16]. Çalışmamızda, bakteriyel menenjit tanısı alan hastaların en sık semptomu literatürle[17,18] uyumlu olarak ateş, ardından ise meninks irritasyon bulguları ve baş ağrısı olarak bulundu.

Bakteriyel menenjitlerde BOS lökosit sayısı çeşitli çalışmalarda, 906-9455/mm^3 arasında bildirilmiş[3,16,17,19], Gurley ve ark.[17] ise bu lökositlerin %80'ini PNL olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda, hastalarımızın BOS lökosit sayılarının ortalaması 2169/mm^3, lökosit tipi değerlendirmesinde ise %89.5'inin PNL ağırlıklı lökositlerden oluştuğunu belirlendi.

Gram boyama ile bakteriyel menenjit tanısı %60-90 oranında konulabilmektedir. Öncesinde antibiyotik kullanımı ile bu oran %20'lere kadar düşmektedir[9]. Çeşitli çalışmalara %4.1[20], %40.4[21], %65.7[22] gibi çok farklı oranlarda tanıya katkısı bildirilmiştir. Çalışmamızda, 19 hastanın 5 (%26.3)'inde Gram boyama ile mikroorganizma belirlenmiştir. Gram boyamada mikroorganizma belirleme oranımızın düşük olma nedenini; önceden kullanılmış antibiyotik tedavisinden dolayı, BOS'daki bakteri yoğunluğunun azlığından kaynaklı veya laboratuvara gelen örnek miktarının azlığından kaynaklı santrifüj edilemeden preperat hazırlanmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Ulusal ve uluslararası çeşitli araştırmalarda *N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae* izolasyon sayıları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Çeşitli araştırmalarda *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* izolasyon sayıları.

	Neisseria meningitidis	*Streptococcus pneumoniae*	*Haemophilus influenzae*
Gurley ve ark. [17]	136 (%18)	23 (%3)	25 (%3)
Kuti ve ark. [23]	2 (%3.5)	23 (%40.4)	28 (%49.1)
Çelik ve ark. [19]	17 (%22.7)	41 (%54.7)	-
Ceyhan ve ark. [24]	138 (%56.5)	55 (%22.5)	50 (%20.5)
Mevcut çalışma	-	3 (%2.2)	1 (%0.7)

Ceyhan ve ark.[24]'nın çok merkezli çalışmalarında, 7 coğrafik bölgede, Akdeniz bölgesi haricinde, en çok görülen akut bakteriyel menenjit etkeninin *N. meningitidis* olduğu, Akdeniz bölgesinde ise *S. pneumoniae*'nin en sık izole edilen etken olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmadaki epidemiyolojik verilerin çalışmamızla uyumlu olduğu belirlendi. Çalışmamızda, en sık etken olarak *S. pneumoniae*, daha sonra *H. influenzae* saptandı. Hiçbir hastamıza *N. meningitidis* saptanamadı. Sonuç olarak yurtdışı ve yurt içi çalışmaların birçoğu ile çalışmamızda bulduğumuz bakteriyel menenjit etkenlerinin uyumlu olduğunu, ancak etkenlerin bölgesel olarak da değişebildiğini söylemek olasıdır.

S. pneumoniae'nın beş yaş altı çocuklarda akut bakteriyel menenjite neden olan en yaygın etken olduğu bildirilmektedir[25]. Yedi valanlı konjuge pnömokok aşısının kullanımından önce beş yaş altı çocuklarda serotip 6A, 6B, 19F ve 23F, erişkinlerde serotip 3 ve 23F en sık invaziv hastalık nedeni olarak bildirilirken, aşılama sonrası ise bunların yerini serotip 19A, 6C, 11A, 15A ve 15B/C almış ve menenjitli hastalarda özellikler 19A ve 22F'de artış saptanmıştır[26]. Yıldırım ve ark.[27] yaptıkları çalışmada, invaziv hastalığa yol açma potansiyeli en yüksek olan serotipleri 3, 7F, 18C, 19A, 22F ve 33F olarak bildirmişlerdir. Aslan ve ark.[28]'nın 1440 sağlıklı çocukta yaptıkları çalışmada iki suşu yüksek düzeyde

dirençli olmak üzere 26 suşta penisilin direnci saptanmıştır. En sık rastlanan serotipleri ise sırasıyla 6, 19, 1, 23, 20 ve 17 bulmuşlardır. Penisilin dirençli suşları ise serotip 20, 23, 14, 6 ve 19 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda, BOS'dan izole edilen üç pnömokok suşu serotip 6A/B, 23F ve 8 olarak belirlendi. İnvaziv pnömokok hastalığına neden olan suşlara bakıldığında serotip 8 dışındaki diğer iki suşun (serotip 6A/B ve 23F) literatürle uygunluk gösterdiği belirlendi. Bölgemizde ve dünyada yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda, serotip 6A/B ve 23F'de görülen direncin ve serotip 8'deki duyarlılığın uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, izole edilen serotip 6A/B ve 23F bölgemizde Aslan ve ark.[28] tarafından yapılan çalışmadaki en sık görülen serotipler arasında yer alırken, bu serotiplerdeki penisilin direnci ile çalışmamızdaki direnç durumunun uyumlu olduğu gözlenmektedir.

LAT ile BOS'da canlı olmayan bakteriler belirleyebildiği için öncesinde antibiyotik tedavisi alan kültür negatif hastalarda bu yöntem bakteriyel antijenlerin belirlenmesi için kullanışlıdır[29]. En yaygın olan bakteriyel menenjit etkenlerinin antijenlerinin belirlenmesinde LAT'ın duyarlılığının %50-100 arasında değiştiği bildirilmektedir[8]. Yadhav[29] yaptığı çalışmaya beş yaş altı klinik şüpheli 100 çocuğu dâhil etmiş, akut bakteriyel menenjit tanısı alan olguların (n=24) 21 (%87.5)'inin kültür ile, 17 (%70.8)'sinin Gram boyama ile, sekizinin (%33.3) LAT ile pozitif olduğunu, Gram boyama ve LAT'ın birlikte değerlendirildiğinde, olguların %85'inin tespit edildiğini belirtmiştir. Yine Hindistan'da beş yaş altı klinik şüpheli 100 çocuğun dâhil edildiği başka bir çalışmada, 31 olguya akut bakteriyel menenjit tanısı konulduğu, bunların 15 (%48.3)'inin kültür ile 22 (%70.9)'sinin Gram boyama ile ve 17 (%54.8)'sinin LAT ile pozitif olduğu bildirilmiştir[30]. Hacımustafaoğlu ve ark.[31] 40 pürülan menenjitli hastadan 14 (%35)'ünde kültür pozitifliği, 21 (%52.5)'inde LAT pozitifliği, kültür pozitif 14 hastanın 8'inde LAT pozitifliği gözlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, LAT ile 17 (%12.4) hastaya bakteriyel menenjit tanısı konuldu. Kültürde üreyen üç *S. pneumoniae* suşu LAT ile pozitifken, bir *H. influenzae* suşu LAT ile negatif bulundu.

Bakteriyel menenjit tanısında altın standart yöntem kültür olmasına rağmen, tanı konmadan başlanan antimikrobiyal tedavi yöntemin duyarlılığını düşürmektedir[24]. Moleküler testler tedavi alan hastalarda dâhil olmak üzere akut bakteriyel menenjit etkeni bakterilerin tanımlamasını anlamlı bir şekilde artırmaktadır[25]. Wu ve ark.[32]'nın kültür, Gram boyama ve PZR yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında %17.7 kültür pozitifliği, %25.1 PZR pozitifliği tbelirlemişlerdir. PZR'nin duyarlılığını %95 ve özgüllüğünü %90 olarak bildirilmiş, örnek alımı öncesinde antibiyotik kullanan hastaların tanısında PZR'nin etkin olduğunu vurgulamışlardır. Nhantumbo ve ark.[25]'nın beş yaş altı 369 çocuğun BOS örneğini dâhil ettikleri çalışmada, PZR ile 193 (%52.3) hastada akut bakteriyel menenjit etkenlerinin belirlendiği, bu hastaların yalnızca 27 (%7.3)'sinin kültüründe üreme olduğu bildirilmiştir. Ceyhan ve ark.[24]'nın bakteriyel menenjit etkenlerini belirlemede Gram boyama, kültür, LAT ve PZR yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada kültür pozitifliği %17, LAT pozitifliği %21.8, PZR pozitifliği ise %100 olarak bildirilmiştir BOS kültüründe üreme olmayan 111 hastanın önceden antibiyotik kullanım öyküsü olduğu vurgulanmıştır. Çalışmamızda, kültür yöntemi ile dört hastaya tanı konulurken, PZR ile 18 hastaya tanı konulmuş, kültüründe bakteri üremesi olan bütün BOS örnekleri PZR ile de pozitif bulunmuştur. Bakteriyel menenjit tanısı alan 19 hastanın 13 (%68.4)'ünün öncesinde antibiyotik kullanım öyküsü olduğu düşünüldüğünde PZR'nin öncesinde antibiyotik kullanılan hastaların tanısında oldukça başarılı olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, menenjit mortalite ve morbiditesi yüksek bir hastalık olduğundan, olası olan en kısa sürede tanı konması ve tedavinin başlanması gerekmektedir. Bu nedenle LAT ve PZR ekonomik olarak Gram boyama ve kültürden pahalı olsa da riskli hastaların erken tanısında, Gram boyama ve kültür sonucu negatif, öncesinde antibiyotik tedavisi almış, kliniği menenjitle uyumlu olan hastalarda kesinlikle uygulanmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerini yapan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Gülhan Örekici Temel'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Bhimraj A.** Acute community-acquired bacterial meningitis in adults: An evidence-based review. *Cleve Clin J Med* 2012; 79(6):393-400. https://doi.org/10.3949/ccjm.79gr.12003
2. **Kanra G, Ceyhan M, Kara A.** Menenjit I: Etiyopatogenez. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2003; 46(1):57-66.
3. **Özdemir H, Tapısız A, Çiftçi E, İnce E, Doğru Ü.** Çocuklarda akut bakteriyel menenjit. *Çocuk Enf Derg* 2010; 4(1):9-14.
4. **Mace SE.** Acute bacterial meningitis. *Emerg Med Clin North Am* 2008; 26(2):281-317. https://doi.org/10.1016/j.emc.2008.02.002
5. **Kanra G, Ceyhan M, Kara A.** Menenjit II: Klinik bulgular ve tanı. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2003; 46(2):128-38.
6. **Topçular B, Topçular NS, Demir GA, Regeniter A.** Beyin omurilik sıvısı analizinde güncel yaklaşımlar. *Arch Neuropsychiatry* 2007; 44(1):28-33.
7. **Scarborough M, Thwaites GE.** The diagnosis and management of acute bacterial meningitis in resource-poor settings. *Lancet Neurol* 2008; 7(7):637-48. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70139-X
8. **Shrestha RG, Tandukar S, Ansari S, et al.** Bacterial meningitis in children under 15 years of age in Nepal. *BMC Pediatrics* 2015; 15:94. https://doi.org/10.1186/s12887-015-0416-6
9. **Devlin CA, Byars DV.** Meningitis: Current evidence and best practice. *Emergency Medicine* 2011; 43(6):6-13.
10. **Sarookhani MR, Ayazi P, Alizadeh S, Foroughi F, Sahmani A, Adineh M.** Comparison of 16S rDNA-PCR Amplification and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis. *Iran J Pediatr* 2010; 20(4):471-5.
11. **Chakrabarti P, Das BK, Kapil A.** Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. *Indian J Med Res* 2009; 129(2): 182-8.
12. **York MK.** Cerebrospinal Fluid Cultures. In: Churc DL eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd Ed. Washington: ASM Press, 2007:3.7.1-3.7.8.
13. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı. *Haemophilus* spp. Suşlarının X ve V Faktör Gereksiniminin Belirlenmesi İçin Standart Uygulama Prosedürleri. In: Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri Kitabı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, 2008:177-179.
14. **York MK, Traylor M, Hardy J.** Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. In: Churc DL eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2007:3.17.1.1-3.17.48.1.
15. **CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
16. **Demiroğlu YZ, Turunç T, Alışkan H, Çolakoğlu Ş, Erdoğan AF, Arslan H.** Toplum kökenli menenjit/meningoensefalitler: Beş yılın retrospektif değerlendirilmesi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30(1):218-26. https://doi.org/10.5336/medsci.2008-8623
17. **Gurley ES, Hossain MJ, Montgomery SP, et al.** Etiologies of bacterial meningitis in Bangladesh: Results from a hospital-based study. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81(3):475-83.
18. **Taşkesen M, Taş MA.** Çocuklarda merkezi sinir sistemi enfeksiyonları. *Dicle Tıp Derg* 2007; 34(2):123-6.
19. **Çelik İ, Özden M, Kılıçoğlu A, Demirdağ K, Kılıç SS.** Yüz yirmi bir menenjit olgusunun retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 2003; 16(1):11-4.
20. **Silva WA, Pinheiro AM, Coutinho LG, Marinho LAC, Lima LFA.** Epidemiological profile of acute bacterial meningitis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(4):455-7. https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000400023
21. **Yamazhan T, Arda B, Taşbakan M, Gökengin D, Ulusoy S, Serter D.** Akut pürülan menenjitli 94 olgunun analizi. *Klimik Derg* 2004; 17(2):95-8.
22. **Mani R, Pradhan S, Nagarathna S, Wasiulla R,** Chandramuki A. Bacteriological profile of community acquired acute bacterial meningitis: A Ten-year retrospective study in a tertiary Neurocare Centre in South India. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25(2):108-14. https://doi.org/10.4103/0255-0857.32715
23. **Kuti BP, Bello EO, Jegede TO, Olubosede O.** Epidemiological, clinical and prognostic profile of childhood acute bacterial meningitis in a resource poor setting. *J Neurosci Rural Pract* 2015; 6(4):549-57. https://doi.org/10.4103/0976-3147.165424
24. **Ceyhan M, Yildirim I, Balmer P, et al.** A prospective study of etiology of childhood acute bacterial meningitis, *Turkey. Emerg Infect Dis* 2008; 14(7):1089-96.

https://doi.org/10.3201/eid1407.070938

25. **Nhantumbo AA, Cantarelli VV, Caireão J, et al.** Frequency of pathogenic paediatric bacterial meningitis in Mozambique: The critical role of multiplex real-time polymerase chain reaction to estimate the burden of disease. *PLoS One* 2015; 10(9):e0138249.
26. **Song JY, Nahm MH, Moseley MA.** Clinical implications of pneumococcal serotypes: Invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *J Korean Med Sci* 2013; 28(1):4-15. https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.1.4
27. **Yildirim I, Hanage WP, Lipsitch M, et al.** Serotype specific invasive capacity and persistent reduction in invasive pneumococcal disease. *Vaccine* 2010; 29(2):283-8. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.032
28. **Aslan G, Emekdaş G, Bayer M, Serin MS, Kuyucu N, Kanık A.** Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains in the nasopharynx of healthy Turkish children. *Indian J Med Res* 2007; 125(4):582-7.
29. **Yadhav ML K.** Study of bacterial meningitis in children below 5 years with comparative evaluation of Gram staining, culture and bacterial antigen detection. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(4):DC04-6.
30. **Mohammadi SF, Patil AB, Nadagir SD, Nandihal N, Lakshminarayana SA.** Diagnostic value of latex agglutination test in diagnosis of acute bacterial meningitis. *Ann Indian Acad Neurol* 2013; 16(4):645-9. https://doi.org/10.4103/0972-2327.120491
31. **Hacımustafaoğlu M, Köksal N, Okan M, Ener B, Ercan İ, Çelebi S.** Çocukluk çağı pürülan menenjitlerinin tanısında lateks bakteri aglütinasyon testlerinin değeri. *Mikrobiyol Bul* 1999; 33(3):147-56.
32. **Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, et al.** Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis* 2013; 13:26. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-26

KONU DİZİNİ

Cilt/Volume 47, 2017

A
aac(6')-Ib, 176
Acinetobacter baumannii, 21, 190
AIDS, 47
Akciğer dışı tüberküloz, 197
Akut bakteriyel menenjit, 205
Ampiyem, 94
Antibakteriyel etkinlik, 26
Antibiyotikler, 21
Antiviral direnç, 1
Antiviral tedavi, 97
Ardışık kültür, 94
Aşı, 97
Avidite, 185

B
Bakteriyemi, 146
Beyin omurilik sıvısı, 131
Biyofilm, 33
Boğaz kültürü, 138

C
Candida parapsilosis, 160
Candida, 114
CLSI, 21

D
Daptomisin, 125
Delta 32,
Diyabetik ayak, 33
Dizi analizi, 114

E
Enterokok, 125
Epidemiyoloji, 190
Escherichia coli, 21, 26, 176
EUCAST, 21

F
Fosfolipaz, 160

G
Galleria mellonella, 67
GAS, 138
Gemella haemolysans, 94
Gerçek bakteriyemi, 89
gyrA mutasyonu, 176

H
Hantavirüs, 6
Havasal küfler, 67
Heartland virüs, 151
Hızlı antijen testi, 138
HIV enfeksiyonu, 47

I
ID32C, 114

İ
İdentifikasyon, 169
İmmünsüpresyon, 146

K
Kan dolaşımı enfeksiyonu, 89
Karbapenem direnç, 190
Karbapenemaz inaktivasyon testi, 78
Karbapenemazlar, 78
Kemirici, 6
Kemokinler, 11
Kene kaynaklı virüsler, 151
Kırım Kongo hemorajik ateşi, 151
Kinolon direnci, 176
Kinupristin/dalfopristin, 83
Kistik fibröz, 106
Klebsiella pneumoniae, 78
Klebsiella spp., 176
Koagülaz negatif stafilokok, 89
Konak-virus ilişkileri, 11
Kontaminasyon, 89
Kronik hepatit, 1
Kronik yara, 33
Kurkumin, 106
Kültür, 197, 205

L
Lateks aglütinasyon testi, 205
Linezolid, 125
Listeria monocytogenes, 146

M
MALDI TOF MS, 169
MALDI-TOF, 114
Mısır unu-tween 80 agar, 114
Mikroskobik inceleme, 197
MLS_B, 83
MRSA, 39

P
parC mutasyonu, 176
Parmelia saxatilis, 26
Parmelia sulcata, 26
Patogenez, 97
Patojenik küfler, 67
Phoenix™, 114
Polimeraz zincir reaksiyonu, 131, 205
Pseudomonas aeruginosa, 21, 106

Q
qnrA, 176
qnrB, 176
qnrS, 176

S
Salgısal asit proteinaz, 160
Santral sinir sistemi enfeksiyonları, 131
Seroloji, 6, 185
Slime, 160
Staphylococcus aureus, 83
Streptogramin, 83

T
Tanı, 197
Tanı algoritmi, 47
Torasentez, 94
Trichosporon, 169
Tür tanımı, 114

V
Vankomisin, 39
Virülans, 67
VISA/hVISA, 39
VZV, 185

Z
Zika virüs, 97

SUBJECT INDEX

Cilt/Volume 47, 2017

A
aac(6')-Ib, 176
Acinetobacter baumannii, 21, 190
Acute bacterial meningitis, 205
AIDS, 47
Air-borne moulds, 67
Antibacterial activity, 26
Antibiotics, 21
Antiviral drug, 1
Antiviral treatment, 97
Avidity, 185

B
Bacteremia, 146
Biofilm, 33
Blood stream infection, 89

C
Candida parapsilosis, 160
Candida, 114
Carbapenem, 190
Carbapenemase inactivation test, 78
Carbapenemases, 78
Central nervous system infections, 131
Cerebrospinal fluid, 131
Chemokines, 11
Chronic hepatitis B, 1
Chronic woung, 33
CLSI, 21
Coagulase-negative *Staphylococcus*, 89
Consecutive culture, 94
Contamination, 89
Corn meal-tween 80 agar, 114
Crimean-Congo hemorrhagic fever, 151
Culture, 197, 205
Curcumin, 106
Cystic fibrosis, 106

D
Daptomycin, 125
Delta 32, 11
Diabetic foot, 33
Diagnose, 197
Diagnostic algorithm, 47
DNA sequencing, 114

E
Empyema, 94
Enterococcus, 125
Epidemiology, 190
Escherichia coli, 21, 26, 176
EUCAST, 21
Extrapulmonary tuberculosis, 197

G
Galleria mellonella, 67
GAS, 131
Gemella haemolysans, 94
gyrA mutation, 176

H
Hantavirus, 6
Heartland virüs, 151
HIV infection, 47
Host-virus interactions, 11

I
ID32C, 114
Identification, 169
Immune suppression, 146
Infecting pathogen, 89

K
Klebsiella pneumoniae, 78
Klebsiella spp., 176

L
Latex agglutination test, 205
Linezolid, 125
Listeria monocytogenes, 146

M
MALDI TOF MS, 169
MALDI-TOF, 114
Microscopic examination, 197
MLS_B, 83
MRSA, 39

P
parC mutation, 176
Parmelia saxatilis, 26
Parmelia sulcata, 26
Pathogenesis, 97
Pathogenic moulds, 67
Phoenix™, 114
Phospholipase, 160
Polymerase chain reaction, 131, 205
Pseudomonas aeruginosa, 21, 106

Q
qnrA, 176
qnrB, 176
qnrS, 176
Quinolone resistance, 176
Quinupristin/dalfopristin, 83

R
Rapid antigen test, 131
Resistance, 190
Rodent, 6

S
Secretory acid proteinase, 160
Serology, 6, 185
Slime, 160
Species identification, 114
Staphylococcus aureus, 83
Streptogramin, 83

T
Thoracentesis, 94
Throat culture, 138
Tick-borne viruses, 151
Trichosporon, 169
True bacteremia, 89

V
Vaccine, 97
Vancomycin, 39
Virulence, 67
VISA/hVISA, 39
VZV, 185

Z
Zika virus, 97

YAZAR DİZİNİ / AUTHORS INDEX

Cilt/Volume 47, 2017

A

Açıkgöz B, 26

Akkan Kuzucu E, 125

Akkaya O, 131

Aksakal FN, 114

Aktaş E, 138, 176

Aktaş O, 151

Akyön Yılmaz Y, 21

Alagöz ÇY, 185

Aliyeva Z, 67

Altındiş M, 47, 78

Altuğlu İ, 185

Altunay E, 125

Apaydın N, 125

Aral M, 94

Aslan FG, 47

Aslan G, 197, 205

Atalay MA, 190

Ayaydın Z, 146

Aydemir Ö, 78

Aydın H, 151

Aydın N, 190

B

Barış A, 169

Bulut C, 89

Bulut E, 138

C

Can Sezgin G, 1

Cebeci Güler N, 160

Cömert F, 176

Ç

Çağlar K, 114

Çiçek M, 83

Çörekli E, 33

D

Dalgıç N, 138

Dansuk Z, 126

Delialioğlu N, 197

Demiray T, 78

Deniz R, 138

Doruk E, 197

Düşmez Apa D, 197

E

Emekdaş G, 197, 205

Erdem G, 125

Erdem H, 67, 114

Erdin M, 6

Eren Topkaya A, 106

Erganiş S, 114

Erköse Genç G, 169

Ersöz G, 197

Ertuğrul MB, 33

Erturan Z, 169

Evren E, 114

Eyigör M, 190

G

Gökalsın B, 26

Gülseren YD, 89

Gümral R, 97

Gür D, 21

Gür Vural D, 146

Gürbüz OA, 125

Güvenç Hİ, 131

Güzelant A, 131

K

Kaan Ö, 1

Kaleli İ, 11

Kalkancı A, 67, 114

Karakaç AE, 89

Karakuş AK, 67

Kaya A, 205

Kaya E, 94

Kaya M, 131

Kayın M, 185

Kılıç Ü, 78

Korkmazgil B, 190

Korkut Tunç E, 39

Köksel O, 197

Köktürk F, 176

Köroğlu M, 78

Kurtoğlu MG, 131

Kuyucu N, 197, 205

Kuzucu Ç, 39

Külah C, 176

M

Maçin S, 21

Mutlu R, 106

O

Opuş A, 131

Otağ ZF, 197

Otlu B, 29

Ö

Öcal DN, 125

Ökahmetoğlu S, 1

Öktem MA, 6

Övet H, 131

Özcan C, 197

Özden Ö, 21

Öztürk ŞB, 33

Özüberk O, 1
Özyiğitoğlu G, 26

P

Parkan ÖM, 1
Pazarlı O, 176
Pelit S, 169
Polat C, 6

R

Rahmanalı Onur A, 146

S

Samancı Aktar G, 146
Sancak B, 83
Saygılı N, 138
Sesal NC, 26

Ş

Şahiner F, 97
Şener B, 83

T

Tekin K, 97
Telli M, 190
Temiz H, 146
Tezcan Ülger S, 205
Timur D, 1
Tokur M, 94
Tosun İ, 160
Tuncer Ö, 83
Turgut H, 11
Türkoğlu G, 89

U

Uçarkuş E, 26

Ü

Ülger M, 197, 205

Y

Yaryüzlü M, 205
Yıldırım N, 26
Yılmaz K, 78
Yüksekkaya Ş, 131

Z

Zeytinoğlu A, 185
Zorbozan O, 11

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 yapılana kadar, söz konusu yazılar yayın programında sırada bekletilir.
- Teslim edilmiş bir metnin tümünün veya bir bölümünün bir başka yerde yayımlanması söz konusu olursa editörlere bilgi verilmesi zorunludur.

Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve teklif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak veya posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.
- İnsanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalarla ilgili olarak etik kurulların onaylarının ve gönüllülerden alınmış yazılı onam formlarının da on-line olarak ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.

Prof. Dr. Çağrı Ergin
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Kınıklı Kampüsü / Denizli
Tel: 0258 296 2491
E-posta: tmcdeditor@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 uyuşmalıdır
- 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 adlan ve MİK veya PFGE gibi kısaltmalar ilk kullanıldıklarında tam olarak, açık şekilleriyle yazılmalı mikroorganizma adı daha sonraki kullanımlarda cins adının ilk harfi kullanılarak kısaltılmalıdır. *Staphylococcus aureus S. aureus* gibi.
- *Escherichia coli* ve *Entamoeba coli* gibi, kısaltmaları aynı olacak adlar aynı yazıda geçtiğinde yazı boyunca kısaltılmadan kullanılmalıdır. Stafilokok, streptokok gibi sadece cins adı geçen cümlelerde dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir.
- Yanında birim gösterilmeyen ondan küçük sayılar yazı ile yazılmalı, rakam ile yazılan sayılara takılar kesme işareti ile eklenmelidir. Üç hasta suşların 28'i gibi. Mümkün olduğunca cümlelere sayılarla başlanmamalıdır.
- Boyama yöntemi olan Gram büyük harfle yazılmalıdır.

Bakteri tanımlamasında ise küçük harf kullanılmalıdır. Örneğin gram negatif kok yazılmalıdır. Negatif / pozitif kelimeleri açık olarak yazılmalı; (-) veya (+) kısaltmaları kullanılmamalıdır.

- 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; noktalamalar, 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 Infec Dis* 1992; 165 (Suppl 1): S156-8.
- Yazarı verilmemiş makale: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J* 1981; 283:628.
- Elektronik formatta makale: Mansur T, Artunkal S. *Fusarium oxysporum* infection of stasis ulser: eradication with measures aimed to improve stasis. *Mycosis* 2009 (DOI: 10.1111/j.1439 0507.2009.01800.x)

B. Kitaplar

- Kitap: Pelczar MJ, Chan ACS, Krieg S. Microbiology. 5th ed. New York: McGrew Hill Co, 2003. (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: Ağaçfidan 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.intemational]. (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.