Cilt / *Volume* 48
Sayı / *Number* 1
Mart / *March* 2018

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✔ Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü
- ✔ Aydın'da Kronik Hepatit C Enfeksiyonlu Hastalarda *IL28B (rs12979860)* Polimorfizminin Dağılımı ve Tedavi Yanıtına Etkisi
- ✔ Gıda Fitokimyasallarının Periodontal Patojenlere Karşı İn Vitro Antimikrobiyal Potansiyellerinin Değerlendirilmesi
- ✔ Avcı Bakteri *Bdellovibrio bacteriovorus* Hücre Özütünün Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 48

Sayı / *Number* 1

Mart / *March* 2018

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 48 Sayı / *Number* 1 Mart / *March* 2018

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*

Orhan Cem Aktepe, İzmir
Işın Akyar, İstanbul
Mustafa Altındiş, Sakarya
Gülçin Bayramoğlu, Mersin
Nilay Çöplü, Kastamonu
Doruk Engin, Ankara
Şafak Ermertcan, İzmir
Duygu Fındık, Konya
Ufuk Hasdemir, İstanbul
Arzu İlki, İstanbul
Ayşe Kalkancı, Ankara
Senem Ceren Karataylı, Ankara
Jülide Sedef Göçmen, Ankara
Selma Gökahmetoğlu, Kayseri
Hatice Güven Külekçi, İstanbul
İpek Mumcuoğlu, Ankara
Alpay Özbek, İzmir
Betil Özhak Baysan, Antalya
Mustafa Özyurt, İstanbul
Duygu Perçin Renders, Afyon
Serhan Sakarya, Aydın
İmran Sağlık, İstanbul
Mehmet Sami Serin, Mersin
Fatma Mutlu Sarıgüzel, Ankara
Güner Söyletir, İstanbul
Serap Süzük Yılmaz, Ankara
Fatih Şahiner, 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* 48 Sayı / *Number* 1 Mart / *March* 2018

İÇİNDEKİLER / *CONTENTS*

DERLEME / *REVIEW*

- **Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü**
  Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance
  Aybala TEMEL, Bayrı ERAÇ **1-13**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / *CLINICAL INVESTIGATIONS*

- **Aydın'da Kronik Hepatit C Enfeksiyonlu Hastalarda IL28B (rs12979860) Polimorfizminin Dağılımı ve Tedavi Yanıtına Etkisi**
  The Distribution of IL28B Polymorphism (rs12979860) and its Effect on the Response to Treatment in Patients with Chronic Hepatitis C Virus in Aydın Province
  Neriman AYDIN, Rifat BÜLBÜL, Adil COŞKUN, Serkan ÖNCÜ, Sevin KIRDAR **14-20**

- **Gıda Fitokimyasallarının Periodontal Patojenlere Karşı İn Vitro Antimikrobiyal Potansiyellerinin Değerlendirilmesi**
  Evaluation of In Vitro Antimicrobial Potentials of Dietary Phytochemicals Against Periodontal Pathogenes
  Elif Burcu BALİ, Gülçin AKÇA, Demet ERDÖNMEZ, Kübra ERKAN TÜRKMEN, Necdet SAĞLAM **21-28**

- **Avcı Bakteri *Bdellovibrio bacteriovorus* Hücre Özütünün Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi**
  Biofilm Inhibition Effect of Cell Extracts of Bdellovibrio bacteriovorus, a Predator Bacterium
  Melek ÖZKAN, Hilal YILMAZ **29-37**

- ***Albicans*-Dışı Candida Türlerinin Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazole İn Vitro Duyarlılığının Referans Sıvı Mikrodilüsyon Yöntem ile Araştırılması: Yeni Türe Özgü Klinik Direnç Sınır Değerleri ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin Uygulanması**
  Investigation of In Vitro Susceptibility of Non-albicans Candida Species Isolated from Clinical Specimens to Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole by Reference Broth Microdilution Method: Application of New Species-Specific Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values
  Gülşen HAZIROLAN **38-44**

- **Vankomisine Dirençli Enterokok Taramasında Kültür Sonuçlarının BD GeneOhm *Van*R Test Sonuçları ile Karşılaştırılması**
  Comparison of the Results of BD GeneOhm VanR Assay with Those of the Culture for Screening of Vancomycin-Resistant Enteroocci
  Reyhan YİŞ **45-51**

- **Doğu Anadolu Bölgesinde Şarbon Etkeni ve Seroprevalansının Araştırılması**
  A Research on the Anthrax Agent and Its Seroprevalance in the Eastern Anatolia Region
  Çiğdem Eda BALKAN, Selahattin ÇELEBİ **52-59**

- **Hepatit B Virüs ile Kronik Enfekse Hastalarda HBsAg Düzeyinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi**
  Quantitative Determination of HBsAg Levels in Chronically Infected Patients with Hepatitis B Virus
  Seda TEZCAN ÜLGER, Nuran DELİALİOĞLU, Özlem KANDEMİR,
  Havva Didem OVLA ÇELİKCAN **60-65**

- **Kan Kültürlerinden Soyutlanan Non Fermentatif Bakterilerin Dağılımlarının ve Antibiyotik Duyarlılık Oranlarının İncelenmesi**
  Quantitative Determination of Antibiotic-Susceptibility Rates of Non-Fermentative Bacterial Isolated from Blood Cultures
  Fatih ATEŞ, Nurullah ÇİFTÇİ, İnci TUNCER, Hatice TÜRK DAĞI **66-71**

- **Sifiliz Tanısında Kullanılan RPR, TPHA Test Sonuçlarının ve Tanı Algoritmalarının Değerlendirilmesi**
  Evaluation of RPR, TPHA Test Results and Diagnostic Algorithms Used in Syphilis Diagnosis
  Cemile SÖNMEZ **72-77**

- **İdrarda Lökosit/Bakteri Analizi Yapan Akım Sitometri Cihazı Sonuçları ile İdrar Kültürü Sonuçlarının Karşılaştırılması**
  Comparison of Results of Urine Cultures and a Flow Cytometric Device That Analyses Urinary Leukocytes/Bacteria
  Emel ÜZMEZ, Serap YAĞCI, Mihriban YÜCEL, Buğra Bilge KESEROĞLU,
  Ayşe Esra KARAKOÇ, Bedia DİNÇ **78-85**

- DÜZELTİLMİŞ YAZI ..... **86 (106)**

- YAZARLARA BİLGİ ..... **V-VI**

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):1-13
doi:10.5222/TMCD.2018.001

Derleme

Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü

Aybala TEMEL, Bayrı ERAÇ
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Biyofilmler. gerek tıbbi cihaz ve biyomateryaller üzerinde gerekse konakçı epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerde oluşabilen ve pek çok farklı hastalıkta rol oynayan mikro-ekosistemlerdir.

Biyofilm oluşumunu belirleme yöntemleri, biyofilm enfeksiyonlarının engellenebilmesi için oldukça önemlidir. Biyofilm oluşumunu saptamada sıklıkla kullanılan kolorimetrik esaslı yöntemlerin çeşitli dezavantajları bulunduğundan, standart, hızlı ve güvenilir yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Biyofilm saptama amacıyla da kullanılabilen çeşitli yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlar arasında, elektrik akımına dirençteki değişimin saptandığı "gerçek zamanlı hücre analizi" yöntemi, kızılötesi ışınların penetrasyonundaki değişimin ölçüldüğü "fiber-optik sensör" yöntemi ve biyofilm matriks komponentlerini saptamaya dayalı "luminisan konjue oligotiyofen" yöntemi umut vadetmektedir. Bu yöntemler ile daha duyarlı, hızlı ve kantitatif olarak biyofilm yapısı belirlenebilmektedir.

Planktonik hâldeki bakterilerin antibiyotik direncinin yanı sıra, biyofilm yapısından kaynaklanan direnç, biyofilm enfeksiyonlarında tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır. Biyofilm direncinin multifaktöriyel bir olay olduğu ve birden fazla mekanizmanın eşzamanlı etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Derlememizde, bakteriyel biyofilmlerin oluşumu ile bunu etkileyen faktörler, biyofilm saptama yöntemleri, biyofilm enfeksiyonları ve biyofilm direncinde rol oynayan etkenler incelenmektedir.

Anahtar kelimeler: *Biyofilm, biyofilm saptama, antibiyotik direnci*

ABSTRACT

Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance

Biofilms are micro-ecosystems that can occur on medical devices and biomaterials, or on host epithelial cells and mucosal surfaces, and play a role in many different diseases.

Methods for determining the formation of biofilm are very important for preventing biofilm infections. Since colorimetric methods which are frequently used to detect biofilm formation have various disadvantages, there is a need for standard, rapid and reliable methods. Various new technologies have been developed that can also be used for biofilm detection. Among these; "real-time cell analysis" method that detects the change in resistance to electric current, "fiber-optic sensor" method in which the change in penetration of infrared rays is measured, and "luminescent conjugated oligothiophene" method based on detecting biofilm matrix components are promising. With these methods, the structure of biofilm can be determined more sensitively, quickly and quantitatively.

In addition to the antibiotic resistance of planktonic bacteria, resistance that results from the biofilm structure, further complicates treatment of biofilm infections. It is thought that the biofilm resistance is a multifactorial event and multiple mechanisms occur simultaneously. In this review, the formation of bacterial biofilms and factors affecting them, biofilm detection methods, biofilm infections and factors that play a role in biofilm resistance are examined.

Keywords: *Biofilm, biofilm detection, antibiotic resistance*

GİRİŞ

Mikrobiyoloji alanında yaşanan gelişmelerin ışığında, günümüzde çeşitli enfeksiyon hastalıklarının patogenezinde mikroorganizmaların planktonik formlarının yanı sıra mikrobiyal biyofilmlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir[1]. Doğal çevrede sık rastlanabilen bir mikrobiyal yaşam formu olan biyofilm, çeşitli mikrobiyal türlerin çevresel etkenlerden korunmak ve yaşamsal faaliyetleri açısından elverişli ortamda kalabilmek adına oluşturdukları bir mikro-ekosistem olarak tanımlanabilir[2].

Alındığı tarih: 25.09.2017
Kabul tarihi: 10.12.2017
Yazışma adresi: Bayrı Eraç, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir
Tel: (0232) 311 40 83
e-posta: eracb@yahoo.com

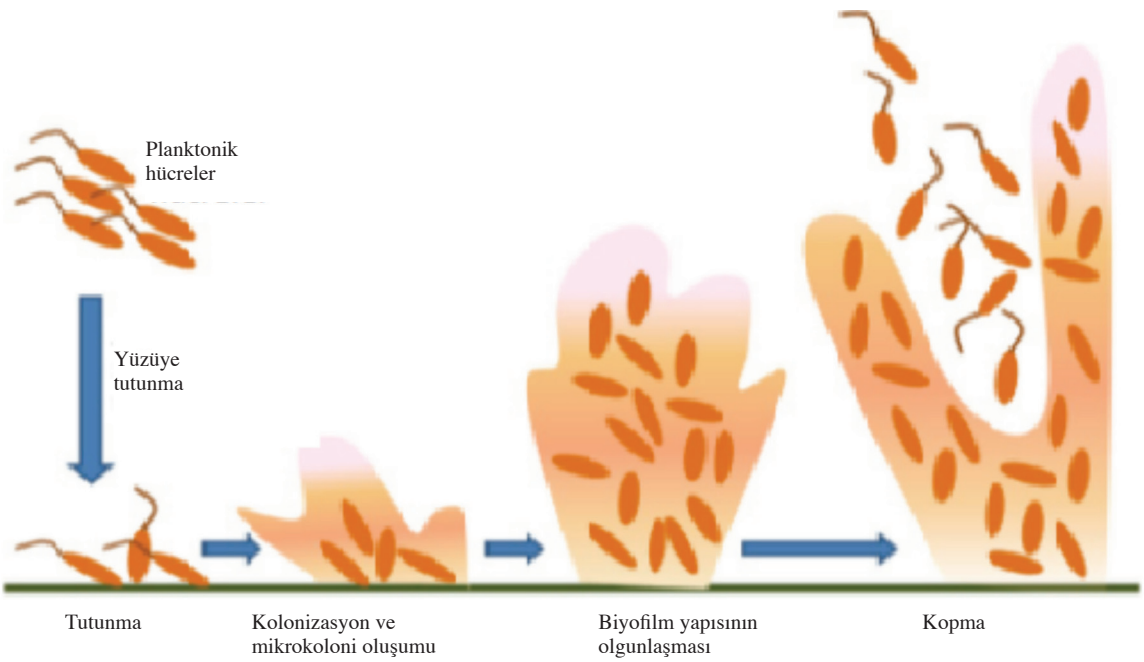
Mikroorganizmaların kendi ürettikleri organik ekzopolisakkarit yapılar aracılığıyla, canlı veya cansız bir ara yüzeye, geri dönüşümsüz olarak tutunmaları sonrasında oluşturdukları biyofilm yapısı, mikroorganizmaya konak savunmasından kaçış, antibiyotiklere direnç açısından avantaj sağlamaktadır. Su arıtma tesisleri, endüstriyel su soğutma kuleleri gibi cansız ortamlarda biyofilm oluşumu, bakteriyi pek çok dezenfektana, pH değişimi ve kuruluğa dayanıklı hâle getirmektedir[2,3].

Yüzeylerde mikrobiyal biyofilm oluşumu, uzun yıllardır araştırılmakta olup, günümüzde kronik doku hasarıyla seyreden pek çok bakteriyel enfeksiyonda majör etkenlerden birisi olarak kabul edilmektedir[3]. İntravenöz kateterler, implantlar, kalp kapakçıkları, kontakt lensler gibi farklı tıbbi araç ve biyomateryaller üzerinde oluşan biyofilmler sonucu gelişen enfeksiyonlar hastalarda ciddi terapötik sorunlara neden olmaktadır[4]. Kronik bakteriyel enfeksiyonların %80'inden fazlası biyofilmler ile ilişkilendirilirken nozokomiyal enfeksiyonların %65'inden de biyofilm yapısının sorumlu olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur[1]. Ayrıca, biyofilmler yalnızca klinik olarak değil çevresel ve endüstriyel ortamlarda da sorunlara neden olabilen yapılardır.

Biyofilm oluşumu

Bakteri hücreleri doğada planktonik formda bulunabildikleri gibi canlı veya cansız bir yüzeye adezyon sonrası çoğalarak mikroorganizma toplulukları hâlinde de bulunabilir[1]. Bu topluluklar tek bir mikroorganizma türünden oluşabilir veya farklı türde mikroorganizmaları içerebilir[5]. Mikroorganizma topluluklarının oluşturduğu biyofilm yapısı, mikroorganizmanın kolonizasyonunu destekleyen, pH değişikliği, besin yetersizliği gibi olumsuz dış ortam koşullarına, antibiyotik, dezenfektan madde gibi kimyasallara karşı dayanıklı olmasını sağlayan önemli bir virülans faktörüdür. Polisakkaritler, protein, ekstraselüler DNA, su ve iyonlar gibi farklı bileşenleri içeren kompleks bir yapı olan biyofilm yapısının oluşumu dinamik bir prosestir[2,6].

Biyofilm oluşumu, Şekil 1'de[7] görüldüğü gibi mikroorganizmanın bir yüzeye tutunması, geri



Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları[7].

dönüşümsüz bağlanma, kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu, kopma evreleri olmak üzere dört basamakta gerçekleşmektedir[4,8].

1) Tutunma: Planktonik yapıda mikroorganizmanın yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlandığı biyofilm oluşumunun ilk evresidir. Bakteri, flagella hareketi ve tutunduğu yüzeyle arasındaki elektrostatik ve fiziksel etkileşimler (Brownian hareketi) sonucu kısa sürede yüzeye tutunur[9].

2) Geri Dönüşümsüz Bağlanma: Yüzeye tutunmuş bakterinin hücre membranındaki proteinlerinin uyarımı gerçekleşir ve bakteri hücreleri arası iletişim mekanizmaları devreye girer. Bakteri hücresi, ekstraselüler polimerik maddeler sentezlemeye başlar[4]. Bakterinin türüne ve çevresel koşullara göre değişik yapıda olabilen bu maddeler biyofilm matriksinin ana bileşenleri olup çoğunlukla ekzopolisakkaritler, ekstraselüler DNA ve proteinlerden oluşmaktadır. Bu matriks ve içeriğindeki maddeler mikroorganizmaların birbirlerine ve yüzeye geri dönüşümsüz bağlanmasına aracılık eder[10].

3) Kolonizasyon ve Mikrokoloni Oluşumu: Yüzeye tutunmuş bakteri hücreleri bölünüp çoğalarak mikrokoloniler oluşturur[11]. Farklı türden mikroorganizma topluluklarını içeren biyofilm yapılarında her tür kendi mikrokolonisini oluşturmakta ve bu mikrokoloniler arasındaki kanallarla suyun ve besin maddelerinin difüzyonu sağlanmaktadır. Ortamdaki planktonik bakterilerin de mikrokolonilere yapışmasıyla kolonizasyon desteklenir[12].

Yeni oluşan mikrokolonilerle bakteri popülasyonu gittikçe büyür. Bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu algılamasına yarayan Quorum Sensing (QS) sinyal sistemi devreye girer. Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal moleküllerinden oluşan bu sistem, bakteri hücresinde spesifik genlerin ekspresyonunu etkileyerek olgun biyofilm yapısının oluşumunu destekler. Bu aşama aynı zamanda biyofilm fenotipinin ortaya çıkmaya başladığı evre olup, mikroorganizmanın dirençli bir yapı kazanmasıyla sonuçlanabilmektedir[13,14].

4) Kopma: Biyofilm oluşumu ve olgunlaşması sonrasında biyofilmde yer alan bakteri hücrelerinde genetik düzenlemeler sonucunda flajeller sentezlenir. Bu sayede hareketlenen bakteri hücresi biyofilmin üst tabakasından koparak ayrılır. Kopan planktonik hücreler yeni odaklara göç eder. Bu durum biyofilmin yayılımına ve bazen yerel enfeksiyonların sistemik hâle geçişine neden olabilmektedir[2,15].

Bakteriler arası iletişim (Quorum sensing) ve biyofilm

Bir bakteri hücresinin canlılığını sürdürebilmesi ve patogenezi açısından, çevreden gelen uyarıları algılayarak yanıt geliştirmesi ve yeni çevre koşullarına uyum sağlaması gerekmektedir. Besin kaynağı ve miktarı, popülasyon yoğunluğu, ozmolarite, pH gibi çevresel faktörlerde değişiklik meydana geldiğinde bakteri bu değişime adapte olmak amacıyla metabolizmasında birtakım düzenlemeler yapmaktadır[14]. "Minimum popülasyon birimi algılama" olarak belirtilen, bakteri hücresinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan QS sistemi, bu adaptasyon ve düzenlemelerde önemli rol oynayan bir sistemdir. QS sistemi yardımıyla, bakteri değişen besin kaynaklarına uyum sağlar, aynı besin için yarışan diğer bir bakteriyle rekabet edebilir ve enfeksiyon sırasında çeşitli virülans faktörlerinin regülasyonunu düzenleyerek konak immün yanıtından kaçabilir. QS sisteminde yer alan sinyal molekülleri ile bakterinin bir odakta toplanması sağlanabilmekte ve böylece biyofilm yapısının temeli oluşmaktadır[16,17].

Sinyal molekülleri, bakteri tarafından normal koşullarda bazal seviyede üretilmektedir. Ortamdaki bakteri sayısının artması durumunda

sinyal molekülleri de belli bir eşik değere ulaşmakta ve bu durumda hem sinyal molekülünün kendisinin hem de bu molekül aracılığıyla kontrol edilen virülans faktörlerinin üretiminde artış gözlenmektedir[18,19]. Üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki gösterdikleri için bu sinyal molekülleri "Otoindükleyiciler" olarak da adlandırılmaktadır[14,20]. QS sinyal moleküllerinin farklı bakteri türlerinde bulunan birçok farklı sınıfı tanımlanmıştır. Açil Homoserin Lakton (AHL) sınıfı sinyal molekülleri Gram negatif bakterilerde, otoindükleyici peptidler Gram pozitif bakterilerde ve otoindükleyici-2 olarak bilinen moleküller hem gram negatif hem Gram pozitif bakterilerde en çok araştırılan sinyal moleküllerindendir[16,21]. Farklı yapıdaki QS sinyal moleküllerinin oluşturduğu yanıtlar farklı olabildiğinden sinyal moleküllerindeki bu çeşitlilik, aynı türden veya farklı türden mikroorganizmalar arası iletişim açısından önem taşımaktadır[22].

QS sinyal molekülleri aracılığıyla farklı türden mikroorganizmalar arasında pozitif veya negatif yönde etkileşimler gerçekleşebilmektedir. Riedel ve ark.[23] farklı türde mikroorganizmalar olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* ile yaptıkları araştırmada her iki bakteri türünün AHL sinyal moleküllerine dayalı QS sistemine sahip olduklarını ve yine bu sinyal molekülleri aracılığıyla birbirlerinin virulans faktörlerinin sentezini desteklediklerini göstermiş-lerdir[22,24].

Kistik fibrozisli hastalarda, hastalığın erken döneminde akciğerlerde görülen *Staphylococcus aureus* kolonizasyonu ilerleyen dönemde yerini *P. aeruginosa*'ya bırakmaktadır. Qazi ve ark.[24] yaptıkları çalışmada bu durumun *P. aeruginosa*'nın sinyal moleküllerinin, *S. aureus*'un efektör molekülü olan RNAIII ekspresyonunu inhibe etmesi ve *S. aureus*'un virulans faktörlerinin oluşumunu engellemesinden kaynaklandığını göstermişlerdir. Sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleşen bu tür çapraz etkileşimlerin, mikroorganizmaların biyofilm oluşumu başta olmak üzere farklı virülans faktörleri üzerinde etkili olduğu ileri sürülmektedir[24].

Biyofilm saptama yöntemleri

Biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığının artmasıyla birlikte biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Biyofilm oluşumunun engellenebilmesi, direncin mekanizmalarının anlaşılabilmesi ve biyofilm enfeksiyonları için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için biyofilm oluşumunu belirleme yöntemleri, bu yöntemlerin doğru uygulanması ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Günümüzde gelişen teknolojinin yardımıyla biyofilm oluşumunu saptamada çok sayıda farklı in vitro yöntemden ve deney hayvanlarında biyofilm enfeksiyonu oluşturulmasına dayalı in-vivo yöntemlerden faydalanılmaktadır.

Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), mikroplak kullanılan yöntemler biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Kuru ağırlığın ve metabolik aktivitesinin saptanmasına dayalı bazı kantitatif yöntemlerle floresan mikroskobisi, konfokal lazer tarama mikroskobisi ve elektron mikroskobisinin kullanıldığı yöntemler de mevcuttur[25-27].

Kongo kırmızılı agar yönteminde; biyofilm oluşturma özelliği araştırılacak bakterinin, içeriğinde belirli miktarlarda sukroz, beyin kalp infüzyon buyyonu, kongo kırmızısı ve agar bulunan besiyerine tek koloni ekimleri yapılır. Genellikle 37°C'de 24 saat olacak şekilde uygulanan inkübasyon sonunda, kolonilerde oluşan renk değişimine göre değerlendirme yapılmaktadır. Siyah-koyu kırmızı renkli koloni oluşumu görülen

suşlar biyofilm üretimi açısından pozitif olarak, pembe-kırmızı renkli koloni oluşumu görülenler ise biyofilm üretimi açısından negatif suslar olarak yorumlanmaktadır[27,28].

Standart cam tüp yönteminde belirli miktarda triptik soy buyyon (TSB) besiyeri içeren cam tüplere bakteri inokulasyonu sonrasında tüpler genellikle 37°C de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüp içeriği boşaltılarak tüplere metilen mavisi eklenir. Belirli bir süre beklendikten sonra tüp içeriği tekrar boşaltılır. Tüpün iç çeperinde boyalı bir tabaka varlığı biyofilm oluşumu açısından pozitif reaksiyon olarak kabul edilmektedir[29].

Christensen yöntemi olarak da bilinen modifiye tüp aderans yönteminde glikozlu TSB besiyeri içeren tüplere bakterinin inokulasyonu ve 37 °C de 24-48 saat inkübasyonu sonrasında tüp içerikleri boşaltılır ve fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanır. Her tüpe belirli ve eşit hacimde olacak şekilde "trypan blue", safranin veya kristal viyole koyularak yavaşça karışması sağlanır. Bir süre bekletildikten sonra tüp içerisindeki boya dökülerek tüpler yeniden boşaltılır. Boşaltılan tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilir ve kurumaya bırakılır. Tüplerin iç çeperinde renkli tabaka varlığı pozitif sonuç olarak kabul edilmektedir. Ayrıca rengin koyuluğu ve kalınlığına göre suşların biyofilm oluşturma kapasitesi çok güçlü, güçlü ve zayıf olarak derecelendirilerek değerlendirme yapılabilmektedir. Renk değişiminin oluşmaması ise negatif sonuç olarak kaydedilir. Ayrıca besiyerinin havayla temas ettiği kısımda boya kalıntısı olabildiği gibi bu durum da negatif sonuç olarak değerlendirilmektedir[30].

Mikroplakların kullanıldığı yöntemler, biyofilm oluşumunu saptamaya yönelik araştırmalarda çeşitli modifikasyonlarla sık yeğlenen yöntemlerdendir. Özellikle spektrofotometrik mikroplak yöntemiyle diğer yöntemlerden daha hassas, spesifik ve kantitatif sonuçlar elde edilebildiği belirtilmektedir[25-27].

Spektrofotometrik mikroplak yönteminde genellikle 96 kuyucuklu mikroplaklar kullanılmaktadır. Belirli hacimde uygun besiyeri [%1-3 glukoz içeren beyin-kalp infüzyon buyyon veya TSB), içeren mikroplak kuyucuklarına bakteri süspansiyonu inokule edilir ve uygun koşullarda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda mikroplaklar ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltılır. Boşaltılan kuyucuklar yavaşça PBS gibi uygun bir yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra her kuyucuğa eşit miktarda boya maddesi eklenir. Bu aşamadan önce metanol veya sodyum asetat gibi bir ajanla biyofilmin fiksasyonu sağlanabilir. Boyama amacıyla safranin veya "trypan blue" kullanılabileceği gibi sıklıkla kristal viyole yeğlenmektedir. Kuyucuklara kristal viyole eklenmesinin ardından boyanın biyofilme penetrasyonu için belirli bir süre beklenir ve sonra kuyucuklar boşaltılarak yeniden yıkama işlemi yapılır. Bu aşamada kristal viyole biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerini boyamakta olup biyofilm yapısına katılmamış diğer hücre ve maddeler yıkama adımlarıyla uzaklaştırılmaktadır. Yüzeye tutunmuş bakteri hücrelerine ve biyofilme zarar vermemek ve doğru sonuçlar elde edebilmek adına yıkama işlemlerinin yavaş yapılması gerekmektedir. Yıkama sonrasında mikroplaklar oda ısısında en az otuz dakika süreyle kurumaya bırakılır. Kuruma sonrasında mikroplaklar etanol, asetik asit veya aseton gibi ajanlarla muamele edilir ve spektrofotometrik ölçüm yapan mikroplak okuyucu cihazda belirli bir dalga boyunda ölçüm yapılarak, her bir kuyucuk için optik dansite değeri belirlenir. Cihaz tarafından kaydedilen bu değerler, kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite değerleriyle karşılaştırılarak biyofilm oluşumunun varlığı ve derecesi saptanabilir[25,26].

Kullanılan farklı yöntemlerde çalışılan mikroorganizmanın türüne göre inokulum miktarı, besi-

yeri, inkübasyon koşulları değişebilmektedir. Bu durum yöntemlerin uygulanmasında modifikasyonları beraberinde getirmekte ve yöntemlerin standardizasyonunu zorlaştırmaktadır. Ayrıca in vitro biyofilm modellerinde ortamdaki besin maddelerinin azalması, konak-patojen etkileşiminin olmaması gibi nedenlerle elde edilen sonuçların in vivo ortamı tam olarak yansıtamadığı düşünülmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarıyla mücadelede antibiyofilm ajanların ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için yapılan araştırmalarda kullanılan klasik in vitro yöntemlere alternatif olabilecek yeni yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Yukarıda sözü edilen kolorimetrik esaslı yöntemler, kullanılan boyaların penetrasyon zorlukları, toksisite ve uygulama zorluğu gibi dezavantajlar taşımaktadır. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (real time cell analyzer-RTCA) yöntemi bu alanda hızlı ve güvenilir sonuçlar verebilecek, kolay uygulanan bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Bu yöntemde yüzeyi altın mikroelektrodlarla kaplanmış özel mikroplaklar kullanılır. Aderan hücrelerin yüzeye tutunması ile elektrik akımına karşı direnç olarak tanımlanan impedansta değişim olur ve bu değişim de hücre sayısı ve biyofilm oluşumu ile orantılıdır[31]. Başka bir söylemle, impedans değişimi ölçümüne dayalı bu yöntemde mikroelektrot taşıyan mikroplakalar kullanılarak biyofilm oluşumu gerçek zamanlı olarak izlenebilmekte ve farklı maddelerin biyofilm oluşumu üzerine etkinlikleri değerlendirilebilmektedir. Ayrıca bu yöntemle elde edilen sonuçların klasik yöntemlerle uyumlu olduğu da belirtilmiştir[32]. Benzer bir mantıkla çalışan bir diğer yöntem de biyofilm gelişimini yine gerçek zamanlı izlemeye olanak veren fiber-optik sensörlerin kullanılmasıdır[33]. Bu yöntem, fiber-optik çekirdek üzerinde gelişen biyofilm tabakanın, yakın kızılötesi ışınların penetrasyonunda değişim yaratması esasına dayanmaktadır. Biyofilm tabakanın kalınlığı arttıkça geçirgenlik yani transmitans azalmaktadır. Bu yöntemle biyofilm inhibitörlerinin etkisi de değerlendirilebilmektedir. Biyofilm oluşumunu belirlemede, fimbria proteini ve bakteriyel selüloz gibi ekstraselüler matriks komponentlerinden yararlanan yenilikçi bir yaklaşım daha kullanılmıştır. Burada "luminisan konjuge oligotiyofen" molekülleri konformasyonel ve spesifik olarak söz konusu ekstraselüler komponentlere bağlanmakta ve hücrelere zarar vermeden biyofilm oluşumunu gözlemlemeye olanak vermektedir[34]. Bu yöntem, söz konusu ekstraselüler matriks komponentlerinin oranları hakkında da bilgi verebilmekte, sıvı kültürlerde, biyotik ve abiyotik yüzeylerde kullanılabilmektedir.

Biyofilm enfeksiyonları

Mikrobiyal enfeksiyonların patogenezini anlamak amacıyla yapılan bilimsel araştırmalarda önceleri patojen mikroorganizmaların yalnızca planktonik formları dikkate alınmışsa da günümüzde gelişen teknoloji ve mikroskobik yöntemler sayesinde mikrobiyal biyofilmlerin enfeksiyonlar açısından önemi ortaya konmuştur. Biyofilm yapısı konakçı immün sistemiyle etkileşerek immün yanıt oluşumuna neden olan ciddi bir enfeksiyon ve enflamasyon etkeni olarak kabul edilmektedir[35]. Mikroorganizma tarafından çevresel stres koşullarında oluşturulan bu yaşam formu, biyotik ve abiyotik farklı yüzeylerde oluşabilmektedir. Gerek tıbbi cihaz ve biyomateryaller üzerinde gerekse konakçı epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerde oluşabilen biyofilmler, kronik yara enfeksiyonlarında, kistik fibrozis, endokardit gibi pek çok farklı hastalıkta rol oynamaktadır[7,17,36].

Günümüzde implantlar, yapay kalp kapakçıkları, protezler gibi kalıcı tıbbi cihazların kullanımındaki artışa paralel olarak biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığı artış göstermektedir. İnsanlarda gelişen yumuşak ve sert doku enfeksiyonlarının %80'inin biyofilm ilişkili enfeksiyonlar olduğu belirtilmektedir[7,36]. Kalıcı tıbbi

cihazlarda gelişen biyofilm enfeksiyonlarında, etken mikroorganizma normal flora üyesi veya nozokomiyal bir patojen olabilmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarında sıklıkla etken olan mikroorganizmalar ve ilişkili tıbbi araçlar Tablo 1'de gösterilmektedir[17,37].

Kullanılan tıbbi araç veya biyomateryalde biyofilm oluşumu, cihazda fonksiyon kaybının yanı sıra hasta için sürekli bir enfeksiyon kaynağı olma riski taşımaktadır. Biyofilm enfeksiyonu başlangıçta asemptomatik seyredebilir. Ancak konakçı immün direncinin düştüğü durumlarda akut enfeksiyon gelişimiyle sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle invaziv girişimler öncesi özellikle immün sistemi baskılanmış ve yüksek risk grubunda olan hastalarda profilaktik amaçlı antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır[17,38,39].

Mikroorganizmanın planktonik formuna etkili olan antibiyotiğin koruyucu dozunun biyofilmde etkisiz kalması bu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırarak mortalite riskini yükseltmektedir[17]. ABD'de yapılan araştırmalarda tıbbi cihazlarda gelişen biyofilm enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranları; penil implantlar, meme implantları ve protezlerde %1-3, santral venöz kateterlerde %3-8, idrar kateterlerinde %10-30 olarak belirtilirken, kardiyak tıbbi cihazların bazıları için bu oranın %25-50'lere ulaştığı saptanmıştır[37,40].

Bakteriyel biyofilmlerin yanı sıra fungal patojenlerin etken oluğu biyofilm enfeksiyonlarıyla da karşılaşılmaktadır. Fırsatçı patojen bir mantar türü olan *Candida albican*s'ın kateterler başta olmak üzere çeşitli tıbbi cihazların yüzeyinde kolonizasyonu ve biyofilm oluşturması yüksek mortaliteyle seyreden kandiyazis tablolarına yol açmaktadır. *Candida parapsilosis, Candida glabrata* ve *Candida tropicalis* kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarına sebep olan diğer mantar türleridir[41].

Ventrikulo-pulmoner şant kullanan hastalarda tekrarlayan menenjitlerinin *Coccidioides immitis*'e bağlı biyofilm enfeksiyonlarıyla, protez kalp kapakçığı kullanan hastalarda endokardit gelişiminin *Aspergillus* biyofilmleriyle ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. *Candida* ve *Aspergillus* biyofilmleri implant kullanan hastalarda gelişen enfeksiyonların %8'inden sorumlu tutulurken, hastanın hayatta kalma oranını %50'ye kadar düşürmeleriyle dikkat çekmektedir[17].

Yabancı cisimle ilişkili olmaksızın canlı organizmada çeşitli koşullarda farklı dokularda, epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerde biyofilm oluşabilmektedir. Daha çok streptokok türlerinin neden olduğu ve diş çürüklerinde önemli rol oynayan dental plaklar, üropatojenik *Escherichia coli*'nin etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae*'ın etken olduğu kronik otitis media, *Staphylococcus lugdunensis* ve *Enterococcus durans*'ın etken olduğu doğal kapak endokarditi canlı dokuda oluşan biyofilm enfeksiyonlarına örnek gösterilebilir. Bu enfeksiyonlarda ilk ola-

Tablo 1. Biyofilm enfeksiyonlarıyla ilişkili tıbbi araçlar ve etken mikroorganizmalar.

Tıbbi araç	Etken mikroorganizmalar
Yapay kalp kapakçıkları	KNS, *Staphylococcus aureus*, Streptokoklar
Koroner stentler	*Staphylococcus aureus*, KNS, *Pseudomonas aeruginosa*
Santral venöz kataterler	KNS, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa,* Enterokoklar, *Candida* spp.
Üretral kateterler	*Escherichia coli, Candida* spp., KNS
Periton diyaliz kateterleri	*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*
Meme implantları	Stafilokoklar, *Escherichia coli*
Koklear implantlar	*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*, Streptokoklar
Ortopedik protezler	Stafilokoklar, *Streptococcus pneumoniae, Propionibacterium acnes*

KNS: Koagülaz Negatif Stafilokok

rak amprik antimikrobiyal tedavi uygulanmaktadır. Ancak biyofilmdeki bakterinin antibiyotiklere duyarlılığının farklı olabileceği göz ardı edilmemeli ve biyofilm etkinliği açısından uygun antimikrobiyal tedavi yaklaşımı yeğlenmelidir[17,42,43].

Biyofilm direnci

Antibiyotik direnci, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi olup, artan direnç oranlarına kıyasla geliştirilen yeni bileşik sayısı oldukça azdır. Planktonik hâldeki bakterilerin antibiyotik direncinin yanı sıra hem konak immün sistemi hem de antimikrobiyal ajanlar açısından önemli bir bariyer olan biyofilm yapısının neden olduğu direnç, biyofilm enfeksiyonlarında tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır[44,45]. Yapılan araştırmalarla, biyofilmde yer alan mikroorganizmaların planktonik formalarına kıyasla antibiyotiklere 100-1000 kat daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Dezenfektanların etkinliği açısından bakıldığında benzer şekilde biyofilm yapısı içerisinde bakterilerin dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençli olabildikleri saptanmıştır[13,46].

Biyofilm direncinde dışa atım pompaları, enzimatik inaktivasyon, ilaç hedefinde mutasyon gibi bilinen antibiyotik direnç mekanizmaları temel sorumlu mekanizmalar olarak görülmemektedir. Ayrıca, biyofilm direncinin multifaktöriyel bir olay olduğu ve birden fazla mekanizmanın eşzamanlı etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir[7,46].

Antibiyotiğin biyofilm içerisine düşük penetrasyonu, biyofilmi oluşturan mikro-çevrede meydana gelen değişiklikler ve biyofilmi oluşturan bakterilerdeki fenotipik ve metabolik değişiklikler, biyofilm direncinin nedenlerine ilişkin ileri sürülen faklı tezler olup, Şekil 2'de sunulmaktadır[46,47].

Antibiyotiğin Biyofilme Düşük Penetrasyonu

Biyofilm matriksi sahip olduğu mekanik ve fizikokimyasal özellikler aracılığıyla antibiyotik ve antiseptikler de dâhil olmak üzere pek çok bileşiğin penetrasyonunu azaltarak biyofilm içerisindeki bakteri hücresine ulaşmasını engellemektedir[48].

Antibiyotiğin penetrasyonundaki düşüşün nedenlerinden birisi olarak biyofilm matriksiyle ilaç molekülü arasında gerçekleşen elektriksel

Şekil 2. Biyofilm direnç mekanizmalarına ilişkin ileri sürülen farklı tezler.

etkileşimler gösterilmektedir. Negatif yüklü matriks polimerinden oluşan biyofilm yapısında, pozitif yüklü antibiyotiğin penetrasyonu bozulmakta ve antibiyotiğin difüzyonu olumsuz etkilenmektedir[47]. Örneğin *P. aeruginosa* biyofilmlerinde negatif yüklü biyofilm polimeri nedeniyle pozitif yüklü aminoglikozid grubu antibiyotiklerin penetrasyonunda düşüş olduğu çalışmalarla saptanmıştır[49]. *E. coli* ve *P. aeruginosa* biyofilmlerinde fosfomisin ve siprofloksasin ile yapılan bir başka çalışmada, ilaç uygulamasından 6 saat sonra ilaçların %50'sinden fazlası hedefe ulaşmışsa da tedavi sonunda bakterinin eradikasyonu açısından istenilen sonuca ulaşılamadığı belirtilmekte ve bu durum biyofilm direnciyle ilişkilendirilmektedir[50].

Antibiyotiğin düşük penetrasyonu ve gecikmiş difüzyonu, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmanın yanında antibiyotiğin subinhibitör konsantrasyonlarına maruz kalan bakterilerde direnç gelişimini tetikleyebilecek bir durum olarak dikkat çekmektedir[51].

Biyofilm pek çok antibiyotik açısından tedavide sorun yaratan bir yapı olsa da florokinolonlar, ampisilin ve rifampin gibi bazı antibiyotiklerin biyofilm matriksinden geçişte sorun yaşamadığı ve biyofilme iyi nüfuz edebildiği çalışmalarla saptanmıştır. Ancak biyofilm enfeksiyonlarında bu antibiyotiklerle uygulanan tedavilerde istenilen sonuca ulaşılamaması ilacın düşük penetrasyonunun tek başına direnci açıklamaya yeterli olmadığını göstermektedir[50].

Mikroçevrede Değişiklik

Biyofilmin farklı katmanlarında oksijen konsantrasyonu, besin maddelerinin yoğunluğu, pH gibi faktörler değişkenlik gösterebilmektedir. Bu durum biyofilmi oluşturan bakteri popülasyonunda üreme hızı ve antibiyotiklere duyarlılık açısından farklılıkları beraberinde getirmektedir[52].

Oksijen konsantrasyonunun biyofilmin alt katmanlarında yüzeye oranla daha düşük olması ve mikroaerofil-anaerobik ortam oluşumu, bu bölgelerde aminoglikozid grubu antibiyotiklerin etkinliğini azaltmaktadır. *P. aeruginosa* biyofilmlerinde alt katmanlarda düşük oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak tobramisin ve siprofloksasinin bakterisidal etkisinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca bazı atık maddelerin biyofilmin alt katmanlarında birikimi sonucu oluşan asidik ortam ve pH değişikliği de antibiyotik aktivitesi açısından olumsuz etkiler yaratmaktadır[53].

Pek çok antibiyotiğin metabolik olarak aktif olan ve üreme fazındaki bakterilere etkinlik gösterdiği bilinmektedir. Özellikle olgun biyofilm yapısında, mikroorganizmalar genellikle daha düşük üreme hızı sergilemektedir. Besin miktarının sınırlı oluşuyla ilişkilendirilen düşük üreme hızının, antibiyotiklerin etkinliğini düşürerek dirence neden olduğu düşünülmektedir. Biyofilm yapısı içerisinde yavaş üreme hızına sahip *P. aeruginosa* suşlarıyla yapılan çalışmada, biyofilmdeki bakterinin beta-laktam antibiyotiklere ve tetrasiklinlere duyarlılığın önemli ölçüde azaldığı, florokinolon aktivitesinin ise üreme hızından etkilenmediği gözlenmiştir[54,55].

Fenotipik Değişiklikler

Bakterinin bir yüzeye tutunmasından olgun biyofilm yapısının oluşumuna kadar geçen süreçte bakteri hücresi çeşitli fizyolojik, metabolik ve fenotipik değişikliklere uğramaktadır. Bu süreçte mikroorganizmada QS sisteminin devreye girdiği ve çeşitli sinyal moleküllerinin salınımının gerçekleştiği bilinmektedir. Bu olayların regülasyonunda görevli genlerin ekspresyonunda yaşanan değişikliklere dayanarak biyofilm direncinin temelinde genetik mekanizmaların olabileceği ileri sürülmektedir.

Mah ve ark.[56] biyofilm oluşturma özelliğine sahip *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada,

bakteride siklik- β-glukan yapıları ve bunların sentezinde görevli enzimi kodlayan *ndvB* geni üzerinde araştırmalar yapmıştır. Çalışma sonucunda, *ndvB* geni aracılığıyla sentezlenen glukan yapılarının periplazmik aralıkta aminoglikozidlerle etkileşek antibiyotiğin hedefe ulaşmasını engellediği gözlemlenmiştir. *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerine yapılan bir başka araştırmada, aminoglikozid grubu antibiyotiklerin bakteri dış membranına afinitesinde azalmanın bakteri-deki *tolA* geni aktivasyonuna bağlı olabileceği belirtilmektedir[56,57].

Bilinen antibiyotik direnç mekanizmalarından olan atım pompalarının bakteride biyofilm direncini arttıran faktörlerden birisi olabileceği ileri sürülmektedir[47]. Biyofilm varlığında bakterilerde bazı atım pompalarının ekspresyon düzeylerinde artış gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarla çok sayıda atım pompasına sahip olan *E. coli*'de AcrAB-TolC pompasının, *P. aeruginosa*'da kinolon direncine aracılık eden mexAB-OprM pompasının biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerinde normal hücrelere kıyasla indüklenmiş durumda oldukları saptanmıştır[47,58]. Bazı atım pompalarının dirençle ilişkisini gösteren farklı çalışmalar sonuçları mevcutsa da doğrudan biyofilm yapılarıyla ilişkili atım pompalarının varlığı tartışmalıdır[59].

Persistan Hücreler

Persistan hücreler, biyofilm direncini açıklamaya yönelik bir diğer yaklaşım olup, bakteri popülasyonlarında persistan hücrelerin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. Persistan hücreler, 1944'te Joseph Bigger tarafından *S. aureus* ile yapılan çalışmalar sonucu tanımlanmıştır. Bigger yaptığı çalışmada 3 günlük penisilin tedavisi uyguladığı 250.000.000 bakteriden oluşan popülasyonda tedavi sonrasında sayıları 100'den az olsa da canlılığını sürdüren bakteri hücreleri olduğunu saptamıştır. Diğer bakterileri öldüren penisilin konsantrasyonunda canlılığını koruyan bu persistan bakteri hücrelerinin büyümeye devam ettiği gözlenmiştir. Aynı çalışma sonucunda bakteri popülasyonu içerisinde toplam nüfusun %1'inden daha azını oluşturan persistan hücrelerin, popülasyondaki diğer bakteri hücreleriyle izogenik yapıda olup, fenotipik farklılıklar taşıdığı, ve bu sayede diğer bakterileri öldüren antibiyotik konsantrasyonlarında yaşamda kalabilen daha dayanıklı hücreler oldukları belirtilmektedir[52,60]. Persistan hücrelerin yüksek dozda antibiyotik maruziyeti sonrasında dahi canlılıklarını koruyabilmeleri tedavide karşılaşılan biyofilm direncinin yanı sıra yineleyen enfeksiyonların nedenleri arasında gösterilmektedir[61].

Günümüzde biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığında yaşanan artış ve mortalite oranlarındaki yükselme endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar ve elde edilen bilgiler ışığında, biyofilm oluşumunda ve direnç mekanizmalarında başta mikroorganizmanın türü ve kullanılan antimikrobiyal ajan olmak üzere pek çok faktör ve farklı mekanizma olabileceği anlaşılmaktadır. Biyofilm enfeksiyonlarıyla mücadelede uygulanabilecek temel yaklaşımlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Klinikte öncelikli hedef, etkin temizlik ve dezenfeksiyon işlemleriyle yüzeylerde biyofilm oluşumunun önlenmesi olmalıdır.
- Biyofilm oluşumunu saptamada modern teknolojilerden yararlanan, hızlı, duyarlı ve güvenilir yöntemlerin kullanılması önem taşımaktadır. Bunlar arasında, elektrik akımına dirençteki değişimin saptandığı "gerçek zamanlı hücre analizi" yöntemi, kızılötesi ışınların penetrasyonundaki değişimin ölçüldüğü "fiber-optik sensör" yöntemi ve biyofilm matriks komponentlerini saptamaya dayalı "luminisan konjue oligotiyofen" yöntemi sayılabilir.
- Biyofilm yapısına daha iyi difüze olduğu bilinen florokinolon ve rifampin gibi antibi-

yotikler ile asetilsistein gibi anti-biyofilm ajanların veya QS inhibitörlerinin kombine kullanımı yararlı olabilecektir.

- Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik olarak, biyofilme etkili solüsyonlar ve yeni antibiyofilm ajanların geliştirilmesi özendirilmelidir.

Terapötik sorunların yanı sıra tedavi maliyetlerinde ciddi artışa yol açan bu enfeksiyonların ortadan kaldırılmasında biyofilm direncinin mekanizmaların aydınlatılması da oldukça önemlidir. Yakın gelecekte bu alanda yapılan çalışmaların hızla artması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318
2. Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E. Antibiotic resistance: a "dark side" of biofilm associated chronic infections. Pol Arch Med Wewn. 2013;123(6):309-13.
3. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. Int J Oral Sci. 2011;3(2): 55-65. https://doi.org/10.4248/IJOS11026
4. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. J Hosp Infect. 2006;64(4):313-25. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028
5. Jones HC, Roth IL, Saunders WM 3rd. Electron microscopic study of a slime layer. J Bacteriol. 1969;99(1):316-25.
6. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. Microorganisms. 2017;5(2):E15. https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015
7. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. Arch Microbiol. 2016;198(1):1-15. https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6
8. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 2000;182(10):2675-9. https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000
9. Lejeune P. Contamination of abiotic surfaces: What a colonizing bacterium sees and how to blur it. Trends Microbiol. 2003;11(4):179-84. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00047-7
10. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881-90. https://doi.org/10.3201/eid0809.020063
11. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol. 1994;176(8):2137-42. https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994
12. van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiol Rev. 1990;54(1):75-87.
13. Omar A, Wright J, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. Microorganisms. 2017;5(1):E9. https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009
14. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. J Infect. 2003;46(4):207-14. https://doi.org/10.1053/jinf.2002.1120
15. Vlassova N, Han A, Zenilman JM, James G, Lazarus GS. New horizons for cutaneous microbiology: The role of biofilms in dermatological disease. Br J Dermatol. 2011;165(4):751-9. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10458.x
16. Redfield RJ. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? Trends Microbiol. 2002;10(8):365-70. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02400-9
17. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. Annu Rev Med. 2008;59:415-28. https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000
18. Kempner ES, Hanson FE. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. J Bacteriol. 1968;95(3): 975-9.
19. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. J Clin Invest. 2003;112(9):1300-7. https://doi.org/10.1172/JCI20074
20. Ohtani K, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, Shimizu T. Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. J Bacteriol. 2009;191(12): 3919-27. https://doi.org/10.1128/JB.01455-08
21. Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. J Bacteriol. 2002;184(10):2576-86. https://doi.org/10.1128/JB.184.10.2576-2586.2002
22. Mdowell P, Affas Z, Reynolds C, et al. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 2001;41(12):503-12. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02539.x
23. Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, et al. N-acylhomoserine-lactone-mediated çommunication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. Microbiology. 2001;147(pt 12):3249-62. https://doi.org/10.1099/00221287-147-12-3249
24. Qazi S, Middleton B, Muharram SH, et al. N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2006;74(2):910-9. https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.910-919.2006
25. Öztürk İ, Yurtman AN, Eraç B, Gül-Yurtsever S, Ermertcan Ş, Hoşgör-Limoncu M. In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. Bratisl Lek Listy. 2014;115(8):483-6.
26. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing

conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007;115(8):891-9. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
27. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:417247. https://doi.org/10.1155/2012/417247
28. Kart Yasar K, Aybar Bilir Y, Pehlivanoglu F, Sengoz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. ANKEM Derg. 2011;25(2):89-93. https://doi.org/10.5222/ankem.2011.089
29. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. Inönü Univ Tıp Fak Derg. 2006;13(3):193-7.
30. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22(6):996-1006.
31. Valdes L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Monitoring in real time the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* upon the intestinal epithelial cell line HT29. J Microbiol Methods. 2015;119:66-73. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.022
32. Gutiérrez D, Hidalgo-Cantabrana C, Rodríguez A, García P, Ruas-Madiedo P. Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology. PLoS One. 2016;11(10):1-17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163966
33. Orii T, Okazaki T, Hata N, Sugawara K, Rahman FA, Kuramitz H. Development of an attenuated total reflection based fiber-optic sensor for real-time sensing of biofilm formation. Anal Sci. 2017;33(8):883-7. https://doi.org/10.2116/analsci.33.883
34. Choong FX, Bäck M, Fahlén S, et al. Real-time optotracing of curli and cellulose in live *Salmonella* biofilms using luminescent oligothiophenes. NPJ Biofilms Microbiomes. 2016;2:16024. https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.24
35. Hänsch GM. Host defence against bacterial biofilms: "Mission Impossible"? ISRN Immunol. 2012;2012:853123.
36. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6(2):201-8. https://doi.org/10.1586/14787210.6.2.201
37. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):167-93. https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
38. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 2005;13(1):34-40. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010
39. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. J Bacteriol. 2001;183(23): 6746-51. https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001
40. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. Clin Infect Dis. 2001;33(9):1567-72. https://doi.org/10.1086/323130
41. Thomas JG, Litton I, Rinde H, Economic impact of biofilms on treatment costs In: Pace JL, Rupp ME, Finch RG, eds. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. Taylor & Francis Group, CRC Press, 2005: 21.
42. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. Science. 2003;301(5629):105-7. https://doi.org/10.1126/science.1084550
43. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. JAMA. 2006;296(2):202-11. https://doi.org/10.1001/jama.296.2.202
44. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. J Intern Med. 2012;272(6):541-61. https://doi.org/10.1111/joim.12004
45. de la Fuente-Nú-ez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock REW. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Curr Opin Microbiol. 2013;16(5):580-9. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013
46. Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. J Hosp Infect. 2004;57(2):97-104. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.01.004
47. Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001;358(9276):135-8. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1
48. Stewart PS. Diffusion in biofilms. J Bacteriol. 2003;185(5):1485-91.
49. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbes Infect. 2003;5(13): 1213-9. ttps://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009
50. Rodríguez-Martínez JM, Ballesta S, Pascual A. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(4):366-8. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.005
51. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(6):2467-73. https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2467-2473.2005
52. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(3):510-43. https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14
53. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. Antimicrob Agents

Chemother. 2003;47(1):317-23. https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003
54. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature. 2002;41(6882):740-3. https://doi.org/10.1038/416740a
55. Wentland EJ, Stewart PS, Huang CT, McFeters GA. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. Biotechnol Prog. 1996;12(3):316-21. https://doi.org/10.1021/bp9600243
56. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature. 2003;426(6964):306-10. https://doi.org/10.1038/nature02122
57. Sadovskaya I, Vinogradov E, Li J, Hachani A, Kowalska K, Filloux A. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: The *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β-(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology. 2010;20(7):895-904. https://doi.org/10.1093/glycob/cwq047
58. Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. Appl Environ Microbiol. 1995;61(3):860-7.
59. Kvist M, Hancock V, Klemm P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2008;74(23):7376-82. https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08
60. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(4):999-1007. https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001
61. Lebeaux D, Fernández-Hidalgo N, Chauhan A, et al. Management of infections related to totally implantable venous-access ports: Challenges and perspectives. Lancet Infect Dis. 2014;14(2):146-59. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70266-4

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):14-20
doi:10.5222/TMCD.2018.014

Araştırma

Aydın'da Kronik Hepatit C Enfeksiyonlu Hastalarda *IL28B* (rs12979860) Polimorfizminin Dağılımı ve Tedavi Yanıtına Etkisi[§]

Neriman AYDIN*, Rifat BÜLBÜL*, Adil COŞKUN, Serkan ÖNCÜ***, Sevin KIRDAR***

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

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

****Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın*

ÖZ

Amaç: *Hepatit C virus enfeksiyonları yüksek oranda kronikleşmekte ve kronik hepatit C infeksiyonlu hastalar ikili veya üçlü antiviral ilaç kombinasyonu ile tedavi edilmektedir. Ancak kronik HCV enfeksiyonlarının tedavisinde hastaların tedaviye verdiği yanıtı etkileyen birçok faktör tanımlanmıştır. Bunlardan biri, tedavi sonunda oluşan kalıcı virolojik yanıt (KVC) ile IL-28B polimorfizmi arasındaki ilişkidir. Bu çalışmada, antiviral tedavi uygulanan kronik HCV hastalarında IL-28B (rs12979860) polifmorfizmindeki dağılım ve kalıcı virolojik yanıt arasındaki ilişkinin gösterilmesi amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmaya peginterferon-ribavirin tedavisi alan kronik HCV enfeksiyonu olan hastalar alınmıştır. Tedavinin 12. haftasında, tedavi bitiminde ve altı ay sonraki kontrollerde HCV RNA araştırılarak, erken ve kalıcı virolojik yanıt belirlenmiştir.*

Bulgular: *Çalışmaya dâhil edilen 41 hastanın, 18'i (%43.9) erkek, 23'ü (%56.1) kadındır. Hastalarda IL28B SNP varyantı olan rs12979860'in %12.2'si CC genotipi, %19.5'i TT genotipi, %68.3'ü TC genotipi olarak tanımlanmıştır. Erken virolojik yanıt CC genotipi taşıyan hastalarda %80, TT genotipinde %75, TC genotipinde %82.1 olarak bulunmuş ve erken virolojik yanıt açısından IL-28B genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hastalarda kalıcı virolojik yanıt ise CC genotipi taşıyan hastalarda %100 iken, TT ve TC genotiplerinde sırasıyla % 62.5 ve % 46.4 olarak bulunmuştur. Kalıcı virolojik yanıt CC genotipi bulunan hastalarda diğer genotiplere göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek oranda bulunmuştur (p=0.035).*

Sonuç: *Bu sonuçlara göre, IL28B (rs12979860) CC genotipleri taşıyan kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda yüksek oranda KVC alınmaktadır. Ancak bölgemizde kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda CC genotipleri düşük oranda taşınmakta, KVC'ın daha düşük oranda olduğu diğer genotipler ise yaygın bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, bölgemizde kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda tedavinin planlanmasında ve takibinde IL28B (rs12979860) CC genotiplerin düşük oranda olduğunun dikkate alınmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Kronik HCV enfeksiyonu, IL28B poliformizmi, peginterferon-ribavirin tedavisi*

ABSTRACT

The Distribution of IL28B Polymorphism (rs12979860) and its Effect on the Response to Treatment in Patients with Chronic Hepatitis C Virus in Aydın Province

Objective: *Hepatitis C virus (HCV) infections have become increasingly chronic and the patients with chronic hepatitis C infections are given dual or triple antiviral drug combinations. However many factors are described affecting the response of the patients to treatment. One of them is the relationship between sustained virological response to treatment and IL-28B polymorphism. In this study, we aimed to investigate the relationship between the distribution of IL-28B (rs12979860) polymorphism.*

Material and Methods: *This study was conducted with chronic HCV patients undergoing peginterferon-ribavirin treatment. HCV RNA was investigated at the 12th week of the treatment, at the end, and at 6th month after treatment to determine early and persistent virological responses.*

Results: *The study included 41 patients, of whom 18 (43,9%) were male and 23 (56.1%) were female. In the study; the IL-28B SNP variant that is rs12979860 was found to be C/C genotype in 12.2%; T/T genotype in 19.5% and T/C genotype in 68.3% of the patients. Early virologic response was found to be 80% in C/C, 75% in T/T, and 82.1% in T/C genotype patients and no statistically significant difference was found between IL-28B genotypes in terms of early virologic response. Sustained virologic response was found as 100%, 62.5% and 46.4% in the C/C, T/T and T/C genotypes, respectively and it was found to be statistically significantly higher in C/C genotypes (p=0.035) relative to others.*

Conclusion: *We concluded that the chronic Hepatitis C patients with IL-28B SNP (rs12979860) C/C genotype have a relatively higher rate of SVR. However, in our region, C/C genotype is detected at a relatively lower rate in patients with chronic HCV and other genotypes with lower SVR are more common. Therefore, in the planning and follow-up of the treatment of patients with chronic HCV, consideration of the relatively lower rate of IL-28B rs12979860 C/C genotype in our region infection is thought to be useful.*

Keywords: *Chronic HCV infection, IL28B polymorphism, peginterferon-ribavirin treatment*

Alındığı tarih: 12.09.2017
Kabul tarihi: 30.10.2017
Yazışma adresi: Neriman Aydın, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın
e-posta: nerimanaydin@yahoo.com
[§]Bu çalışma, HCV 2015 Symposium - 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (9-13 Ekim 2015, Strasbourg, Fransa) ve "3.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (18-2 Kasım 2015, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.
[§]Bu araştırma Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından TPF-14003 sayı ile desteklenmiştir.

GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV) karaciğerde yol açtığı klinik tablolarla, önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir[1]. Dünyada yaklaşık 200 milyon kişi kronik HCV hastasıdır ve her yıl 4 milyon kişiye HCV bulaştığı tahmin edilmektedir[2]. HCV prevalansı coğrafik bölgeler arasında farklılık göstermekte olup, en yaygın olduğu bölgelerin başında Mısır gelmektedir[3]. Orta Avrupa'da prevalans %0.2-1 arasında değişirken, Doğu Avrupa'da bu oran %4-6'ya çıkmaktadır[4]. Ülkemizde HCV prevalansı ise %0.4-1 arasında değişmektedir[5].

Kronik HCV enfeksiyonlu hastalara uygulanan tedaviler arasında pegile-interferon (PEG-IFN)/ribavirin ikili veya bunlara proteaz inhibitörlerinin eklendiği üçlü tedavi protokolleri bulunmaktadır. Bunlar arasında pegIFN-α, ribavirin kombinasyon tedavisi alan hastaların yarısından fazlasında başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Tedavinin başarısı 12. hafta, tedavinin bitimi ve altı ay sonra yapılan kontrollerde HCV RNA seviyelerine göre değerlendirilmektedir[6-8]. Kronik HCV enfeksiyonlarında tedavi başarısını etkileyen faktörler arasında yaş, cinsiyet, ırk/etnisite, kilo, insulin direnci, yağlı karaciğer hastalığı, kolestrol seviyesi, depresyon, alkol kullanımı, gen mutasyonları bağlı gelişen polimorfizm gibi konağa ait pek çok faktörün rol oynadığı gösterilmiştir[9]. İnsanlarda "Genom-wide Association" (GWA) çalışmalarıyla hepatit C tedavisi yanıtı ile tek nükleotid mutasyonuna bağlı polimorfizmler (SNP) arasında ilişki bulunmuştur[10].

IL28B, 19q13 kromozomu üzerinde kodlanmaktadır ve kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda ilaç tedavisiyle alınan kalıcı virolojik yanıtı etkileyen faktörlerden biridir. Bu hastalarda tedaviye verilen yanıt ile *IL28B*'nin SNP varyantları arasında en güçlü ilişki rs12979860 varyantında görülmekte ve bunu rs8099917 varyantı takip etmektedir[11,12]. Bu nedenle *IL28B* polimorfizminin belirlenmesi, HCV enfeksiyonlarının tedavisini planlama ve tedavi protokolünün seçilmesinde etkili olabilmektedir. Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilmekte olan kronik HCV hastalarında antiviral tedaviye erken ve kalıcı viral yanıt ile *IL-28B* (rs12979860) polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

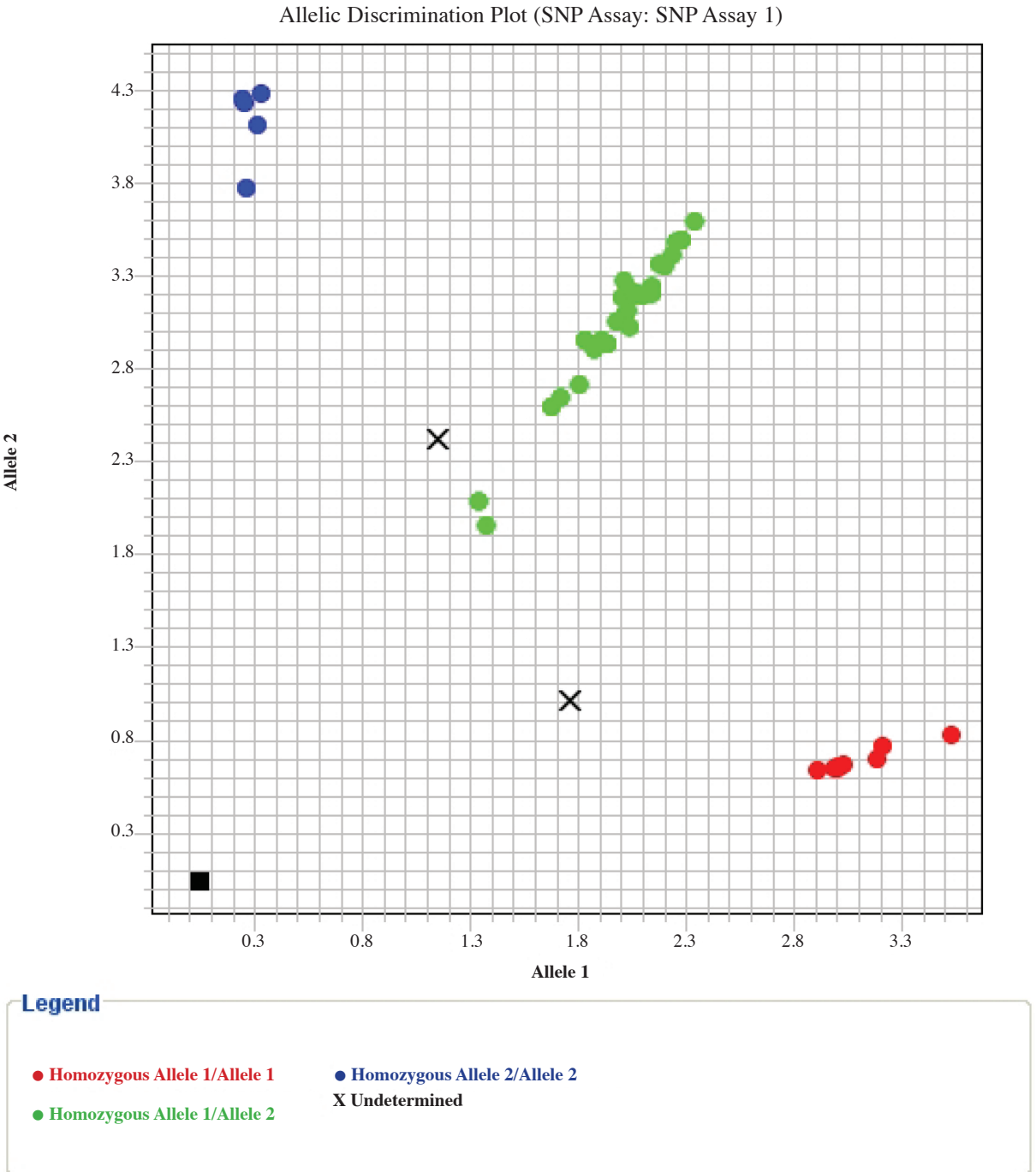
Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, gastroenteroloji ve enfeksiyon hastalıkları kliniklerinde Şubat 2014-Ocak 2015 tarihleri arasında takip edilen peg interferon-ribavirin tedavisi alan kronik HCV enfeksiyonlu hastaların örneklerinde yapılmıştır. Araştırma için Adnan Menderes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (2013/267) izin alınmıştır.

Çalışma gurubunu, kronik hepatit C standart tedavi protokollere bağlı olarak 24 ve 48 hafta olarak peg interferon-ribavirin tedavisi uygulanmış hastalar oluşturmaktadır. Çalışmaya 41 kronik HCV enfeksiyonlu hasta dâhil edilmiştir. Hastalar 22-79 yaş arasında olup, yaş ortalaması 55.5±12 yıl ve hastaların 18'i (%43.9) erkek, 23'ü (%56.1) kadındır. Hastaların HCV-RNA düzeyleri ve HCV genotipleri 12, 24, 48. hafta ve tedavi sonrası 6. ayda yapılan rutin takipleri sırasında yapılan tetkik sonuçlarının geriye dönük incelenmesi ile elde edilmiştir. Tedavinin 12. haftasında HCV RNA negatif veya ≥2 log10 (100 kat) azalma olması erken virolojik yanıt, tedavi bitiminde ve altı ay sonraki kontrollerde HCV RNA negatif olması kalıcı virolojik yanıt olarak kabul edilmiştir.

Kronik HCV infeksiyonlu hastalarda *IL28B* SNP varyant analizi için, kan örneklerinden önce PureLink® Genomic DNA Mini Kits

(Invitrogen, Calsbord CA, ABD) kitleri ile genomik DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstrakte edilen DNA'ların miktarı ve saflığı ölçüldü. *IL28B* (rs12979860) analizi TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied biosystems, ABD) kitleri ile gerçek zamanlı PZR yöntemi ile The Applied Biosystems® StepOne™ (Applied Biosystems, ABD) cihazı ile yapıldı (Şekil 1).

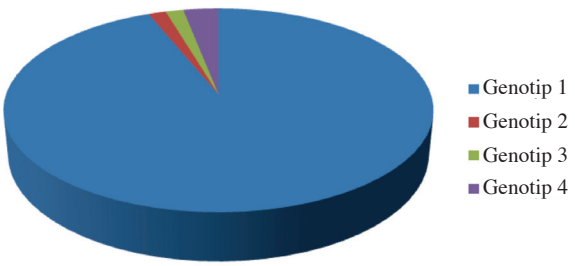
Araştırmada elde edilen veriler SPSS 18.0 (Chicago, IL, ABD) paket programı ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.



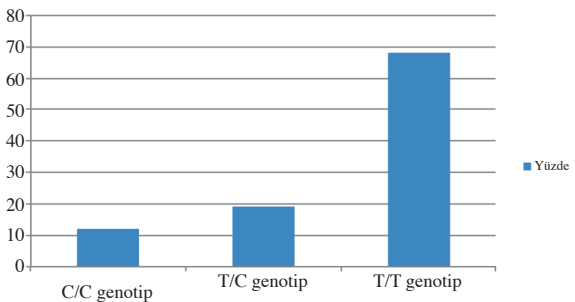
Şekil 1. ***The Applied Biosystems® StepOne™*** **(Applied biosystems/ABD) gerçek zamanlı PZR cihazında** ***IL28B*** **SNP varyantı olan rs12979860'in genotiplerinin sonuç grafiği (Allel 1/Allel 1: TT genotipi; Allel 2/Allel 2: CC genotipi)**

BULGULAR

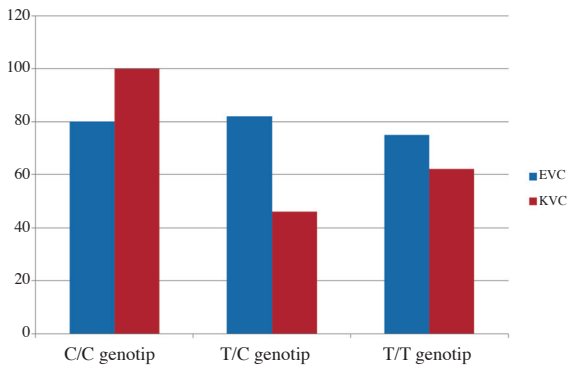
Çalışmaya dâhil edilen 41 hastanın 37'sinde (%90.2) HCV genotip 1, 1'i (%2.4) genotip 2, 1'i (%2.4) genotip 3 ve 2'si genotip 4 (%4.9) saptanmıştır (Şekil 2, Tablo 1). Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda *IL28B* SNP varyantı olan rs12979860'in CC genotipi %12.2, TT genotipi %19.5, TC genotipi %68.3, tanımlanamayan %4.6 olarak bulunmuştur (Şekil 3). Hastalarda erken virolojik yanıt CC genotipinde %80, TT genotipinde %75, TC genotipinde %82.1 olarak bulunmuştur. Erken virolojik yanıt açısından *IL-28B* genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tedavinin 48. haftasından sonra değerlendirilen kalıcı virolojik yanıt CC genotipinde %100 iken TT ve TC genotiplerinde sırasıyla %62.5 ve %46.4 olarak bulunmuştur. CC genotipi bulunan kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda kalıcı virolojik yanıt diğer genotiplere göre istatistiksel olarak anlamlı oranda (p =0.035) daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4, Tablo 1).



Şekil 2. Kronik HCV enfeksiyonlu hastaların HCV genotiplerinin dağılımı.



Şekil 3. Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda *IL28B* (rs12979860) genotiplerinin dağılımı.



Şekil 4. Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda EVC ve KVC yüzdelerinin *IL28B* (rs12979860) genotiplerine göre dağılımı (EVC: Erken virolojik yanıt; KVC: Kalıcı virolojik yanıt).

Tablo 1. Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda peginterferon-ribavirin tedavisine yanıtın, HVC ve *IL28B* (rs12979860) genotiplerine dağılımı.

	Hasta		Peginterferon-ribavirin tedavisine virolojik yanıt			
Hasta no	Sayı	%	Erken	Kalıcı	HCV genotipi	*IL28B* (rs12979860) genotipi
2, 3, 7, 11, 13, 20, 23, 24, 38, 40	10	24.4	+*	+	1	TC
8, 10, 12, 14, 22, 30, 39	7	17.1	+	-**	1	TC
5, 18, 19, 32, 37	5	12.2	+	+	1	TT
6, 21, 25, 31	4	9.8	+	+	1	CC
9, 15, 17, 35	4	9.8	-	-	1	TC
27	1	2.4	-	-	1	TT
28	1	2.4	+	-	1	TT
41	1	2.4	-	+	1	CC
1, 16	2	4.9	+	-	1b	TC
4	1	2.4	+	+	1b	TC
29	1	2.4	-	-	1b	TC
33	1	2.4	-	-	2	TT
36	1	2.4	+	-	3	TC
26	1	2.4	+	+	4	TC
32	1	2.4	+	+	4	TT

**+: tedaviye yanıt var. **-: tedaviye yanıt yok*

TARTIŞMA

Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda *IL28B* SNP varyantı tedavi başarısını etkileyen faktörlerden biri olarak bildirilmektedir. *IL28B*'nin (rs12979860) CC genotipleri kronik HCV enfeksiyonlarında kalıcı virolojik yanıtla en güçlü ilişkiye sahip genotip olduğu gösterilmiştir[8-10]. Bu çalışmada, toplam 41 hastanın *IL28B* (rs12979860) genotipleri araştırılmıştır ve yalnızca %12.5'inde CC genotipi bulunmuştur (Şekil 3). Kalıcı virolojik yanıt CC genotipinde %100 iken, TT ve TC genotiplerinde sırasıyla %62.5 ve %46.4 oranında gerçekleşmiştir (Şekil 4). Bu sonuçlar, yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu ile benzerlik göstermektedir. Dünyada *IL28B* SNP rs12979860 CC genotipi ile KVC gelişimi arasındaki ilişkiyi gösteren birçok çalışma yapılmıştır[13-25]. Bazı çalışmalarda ise, *IL28B* (rs12979860) genotipi ile KVC gelişimi arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir[26,27]. Çalışmamızda, *IL28B* (rs12979860) CC genotipi taşıyan kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda yüksek oranda KVC belirlenmiştir. Ancak bölgemizde bu genotipi taşıyan hastaların oranının az olması ve diğer genotiplerin yüksek oranda taşınması KVC açısından bir sorun oluşturacağını düşündürmektedir. Sonuç olarak, TC genotipini taşıyan hastalarda KVC %46 oranına kadar düşmektedir. Bu bulgular, kronik HCV enfeksiyonlu hastalardaki *IL28B* (rs12979860) genotipinin belirlenmesinin, KVC için bir öngörü oluşturacağını ve tedavinin ikili veya üçlü kombinasyon olarak seçiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

HCV prognozunu belirleyen en önemli faktörlerden biri de HCV genotipidir. Genotip 1 en yaygın görülen ve tedaviye en dirençli genotip olarak bilinmektedir[28]. Bu çalışmada, çok yüksek sıklıkta (%90.2) HCV genotip 1 tanımlanmıştır (Şekil 1, Tablo 1). Ülkemizin hem doğusu ve hem batısında yapılan çalışmalarda da genotip 1 yaygın olarak bulunmaktadır[5,29-31]. Ancak dünyada bazı coğrafi bölgelere göre HCV genotiplerinin dağılımında farklılıklar görülebilir[32]. Avusturya'da çoğunluğunu HCV genotip 1 ve genotip 4 ile enfekte kronik HCV hastaların oluşturduğu bir grup ile yapılan çalışmada, *IL28B* SNP rs12979860 CC genotipi taşıyanların %85'inde KVC geliştiği gözlenmiştir[14]. HCV genotip 2 / genotip 3 ile enfekte 268 kronik HCV hastasında yapılan bir başka çalışmada, *IL28B* SNP rs12979860 CC genotipi taşıyanların %82'sinde KVC geliştiği ve bu genotipi taşımayanlarla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bildirilmiştir[15]. Pakistan da HCV genotip 3 ile enfekte hastalarda yapılan bir çalışmada, *IL28B* SNP rs12979860 CC genotipi taşıyanların %84.2'sinde KVC geliştiği gözlenmiştir[16]. HCV genotiplerin bilinmesi enfeksiyonun tedavisinde uygun yaklaşımın belirlenmesi açısından önemli olmaktadır. Hastalarda HCV genotip 1 tanımlanması durumunda tedavi süresi 48 hafta, yüksek dozda pegIFN/ribavirin ikili kombinasyon tedavisi önerilmektedir[33]. Çalışmamızda, HCV genotipleri ile *IL28B* (rs12979860) genotipleri arasında bir ilişki gösterilememiştir. Bu durum hastaların büyük çoğunluğunda HCV genotip 1 bulunması ve diğer genotiplerin az sayıda olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Tablo 1).

Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda *IL28B* (rs12979860) CC genotipine rastlanma oranları ırka bağlı değiştiği görülmektedir. Afrikalılarda bu genotip %23-50 oranında iken, Doğu Asya'da %90-100 olarak bildirilmektedir[19]. Ülkemizde Trakya bölgesinde kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda yapılan bir araştırmada, *IL28B* (rs12979860) CC genotip sıklığı %50 bulunmuştur[34]. Çalışmamızda, toplam 41 hastanın %12.5'inde *IL28B* (rs12979860) CC genotipi bulunmuştur. *IL28B* (rs12979860) CC genotipinin düşük bulunmasının bölgesel farklılık ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde ve dünyada HCV enfeksiyon epide-

miyolojisi ile ilgili yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Hastalığın prognozunu etkileyen faktörler arasında yaş ve cinsiyetinde olduğu bildirilmiştir. İleri yaş ve erkek cinsiyetine sahip hastalarda tedaviye yanıtlarının, hastalık prognozlarının kötü olduğu gösterilmiştir[2,35-38]. Ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, HCV enfeksiyonunun genellikle 54 yaş ve üstünde belirlendiği görülmüştür[6]. Çalışmamızda, kronik HCV enfeksiyonlu hastalar 22-79 yaş arasında ve yaş ortalaması 55.5±12 olarak bulundu. Hastalar kırk yaş sınır alınarak ikiye ayrılarak değerlendirilmiş, hasta grupları arasında prognoz açısından bir fark görülmemiştir. Ancak çalışmaya alınan hastaların %92.3'ünün kırk yaş üzerinde olması nedeniyle, HCV enfeksiyon prognozu ile ileri yaş arasında anlamlı bir ilişkinin saptanamadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da kadın cinsiyet oranı daha yüksektir.

Sonuç olarak, *IL28B* (rs12979860) CC genotipleri taşıyan kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda yüksek oranda kalıcı virolojik yanıt alınmaktadır. Ancak bölgemizde kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda bu genotipler düşük oranda taşınmakta ve yaygın olarak bulunan TT ve TC genotiplerinde ise KVC daha düşük oranlarda bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, bölgemizde kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda tedavinin planlanmasında ve takibinde *IL28B* (rs12979860) CC genotiplerin düşük oranda olduğunun dikkate alınmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abacıoğlu H, Öktem M A. Hepatit C virüsü. Us A D, Ergünay K (Ed.). Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 1. Baskı. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2012:336-37.
2. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. J Hepatol. 2014;61(Suppl 1):S58-68. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012
3. Mohamoud YA, Mumtaz GR, Riome S, Miller D, Abu-Raddad LJ. The epidemiology of hepatitis C virus in Egypt: a systematic review and data synthesis. BMC Infect Dis. 2013;288. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-288
4. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. J Hepatol. 2008;48(1):148-62. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.033
5. Tozun N, Ozdogan O, Cakaloglu Y, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP study. Clin Microbiol Infect. 2015;21(11):1020-6. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.028
6. Aygen B, Keten D, Akalın H, et al. Kronik Hepatit C Virusu İnfeksiyonunun Yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği viral hepatit çalışma grubu uzlaşı raporu. Klimik Derg. 2014;27(Özel Sayı):ö19-39. https://doi.org/10.5152/kd.2014.27
7. Akıncı E, Kayaarslan B Ü, Tanrıcı Başbuğ A, Eren S, Öngürü P, Bodur H. Genotip 1b kronik hepatit C hastalarında kalıcı virolojik yanıtın değerlendirilmesi. Viral Hepatit Derg. 2013;19(2):80-4. https://doi.org/10.4274/Vhd.68077
8. Strader DB, Seeff LB. A brief history of the treatment of viral hepatitis C. CLD. 2012;1(1):6-11.
9. Asselah T, Estrabaud E, Bieche I, et al. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. Liver Int. 2010;30(9):1259-69. https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02283.x
10. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet. 2009;41(10):1105-9. https://doi.org/10.1038/ng.449
11. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. Nat Genet. 2009;41(10):1100-4. https://doi.org/10.1038/ng.447
12. Ersöz G. Hepatit C infeksiyonu tedavisinde konakla ilgili faktörler, *IL28B* polimorfizmi. ANKEM Derg. 2012;26(Ek 2):E144-9.
13. Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. Hepatology. 2010;52(1):33-7. https://doi.org/10.1002/hep.23624
14. Stattermayer A F, Stauber R, Hofer H, et al. Impact of *IL28B* genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naive patients with chronic hepatitis C. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9(4):344-50. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.07.019
15. Mangia A Thompson AJ, Santoro R, et al. An *IL28B* polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. Gastroenterology. 2010;139(3):821-7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.079
16. Aziz H, Raza A, Ali K, Khattak JZ, Irfan J, Gill ML. Polymorphism of the *IL28B* gene (rs8099917, rs12979860) and virological response of Pakistani hepatitis C virus genotype 3 patients to pegylated interferon therapy. Int J Infect Dis. 2015;30:91-7.

https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.09.021
17. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, et al. *Interleukin-28B* polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. Gastroenterology. 2010;139(1):120-9. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.013
18. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, et al. Replicated association between an *IL28B* gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. Gastroenterology. 2010;138(7):2307-14. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.02.009
19. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature. 2009;461(7265):798-801. https://doi.org/10.1038/nature08463
20. Halfon P, Bourliere M, Ouzan D, et al. A single *IL28B* genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C genotype 1 virus. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2011;23(10):931-5. https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328349d0ef
21. Calisti G, Tavares A, Macartney MJ, et al. *IL28B* genotype predicts response to chronic hepatitis C triple therapy with telaprevir or boceprevir in treatment naïve and treatment-experienced patients other than prior partial- and null- responders. Springerplus. 2015;4:357. https://doi.org/10.1186/s40064-015-1137-x
22. Silva ÁMC, Aires RS, Silva SM, et al. Association between the *IL28b* rs12979860 polymorphism and therapy response in patients infected with genotype 1 of hepatitis C virus in Central Brazil. Rev Pathol Trop. 2016;45(2):152-60. https://doi.org/10.5216/rpt.v45i2.42013
23. Scott J, Holte S, Urban T, et al. *IL28B* Genotype effects during early treatment with peginterferon and ribavirin in difficult-to-treat hepatitis C virus infection. J Infec Dis. 2011;204(3):419-25. https://doi.org/10.1093/infdis/jir264
24. Lin CY, Chen JY, Lin TN, et al. *IL28B* SNP rs12979860 is a critical predictor for on-treatment and sustained virologic response in patients with hepatitis C virus genotype-1 infection. PLoS One. 2011;6(3):e18322. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018322
25. Jiménez-Sousa MA, Fernández-Rodríguez A, Guzmán-Fulgencio M, Álvarez MG, Resino S. Meta-analysis: implications of *interleukin-28B* polymorphisms in spontaneous and treatment-related clearance for patients with hepatitis C. BMC Med. 2013;11:6.
26. Heo NY, Lim YS, Lee W, et al. No association between the *IL28B* SNP and response to peginterferon plus ribavirin combination treatment in Korean chronic hepatitis C patients. Clin Mol Hepatol. 2014;20(2):177-84. https://doi.org/10.3350/cmh.2014.20.2.177
27. Moghaddam A, Melum E, Reinton N, et al. *IL28B* genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. Hepatology. 2011;53(3):746-54. https://doi.org/10.1002/hep.24154
28. WHO. Guidelines for the screening,care and treatment of persons with hepatitis C infection. World Health Organization. 2014:25-7.
29. Altuğlu İ, Soyler İ, Özacar T, Erensoy S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. Int J Infect Dis. 2008;12(3):239-44. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.07.003
30. İba Yılmaz S, Erol S, Özbek A, Parlak M. Distribution of viral genotypes and extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C in Eastern Turkey. Turk J Med Sci. 2015;45(1):70-5. https://doi.org/10.3906/sag-1311-52
31. Barut HŞ, Günal Ö. Dünyada ve ülkemizde hepatit C epidemiyolojisi. Klimik Derg. 2009;22(2):38-43
32. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J Hepatol. 2014;61(Suppl 1):S45-57. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.027
33. Türkiye kronik viral hepatit tanı ve tedavi rehberi 2015. http://www.vhsd.org/tr/files/download/p1be358ft11gnhhgqoscrunh8b4.pdf (Erişim:Eylül 2017).
34. Taheri S, Aygen B, Korkmaz K, Yıldız O, Zararsız G, Canatan H. Characterization of the *Interleukin-28B* gene rs12979860 C/T polymorphism in Turkish chronic hepatitis C patients and healthy individuals. Balkan Med J. 2015;32(2):147-55. https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2015.15156
35. Chen SL, Morgan RT. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. Int J Med Sci. 2006;3(2):47-52. https://doi.org/10.7150/ijms.3.47
36. de Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. Ann Hepatol. 2003;2(1):5-11.
37. Marcus EL, Kaspa R. Chronic hepatitis C virus infection in older adults. Clin Infect Dis. 2005;41(11):1606-12. https://doi.org/10.1086/497597
38. Horiike N, Masumoto T, Nakanishi K, et al. Interferon therapy for patients more than 60 years of age with chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 1995;10(3):246-9. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1995.tb01088.x

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):21-28
doi:10.5222/TMCD.2018.021

Araştırma

Gıda Fitokimyasallarının Periodontal Patojenlere Karşı İn Vitro Antimikrobiyal Potansiyellerinin Değerlendirilmesi[§]

Elif Burcu BALİ*, Gülçin AKCA, Demet ERDÖNMEZ***, Kübra ERKAN TÜRKMEN****, Necdet SAĞLAM*******

**Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Ankara*

***Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara*

****Aksaray Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aksaray*

*****Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji/Biyoteknoloji Bölümü, Ankara*

******Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara*

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, Porphyromonas gingivalis ATCC 33277, Prevotella intermedia ATCC 25611 ve Aggregatibacter actinomycetemcomitans ATCC 43718 periodontal patojenlerine karşı gıdalarda bulunan fitokimyasallardan kuersetin, kurkumin, apigenin, pirogallol, gallik asit, luteolin ve hidroksitirozolün in vitro antimikrobiyal potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmada agar kuyucuk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak fitokimyasalların antimikrobiyal potansiyelleri araştırılmıştır. Agar kuyucuk yönteminde fitokimyasalların antimikrobiyal aktiviteleri 3 mg/ml, mikrodilüsyon yönteminde ise 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.093, 0.046, 0.023 ve 0.011 mg/ml konsantrasyonlarda incelenmiştir. Pozitif ve negatif kontrol olarak amoksisilin (20 µg/disk ve 0.04-0.0015 mg/ml) ve DMSO (≤%10) test edilmiştir.*

Bulgular: *Çalışma sonuçlarına göre, fitokimyasalların çoğunun patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve patojenler üzerinde en etkili fitokimyasalın kuersetin olduğu belirlenmiştir. Kuersetin, kurkumin, luteolin, apigenin ve gallik asit tüm patojenlere karşı en iyi antimikrobiyal potansiyeli olan fitokimyasallar olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, %4 (v/v) ve daha az orandaki DMSO'nun patojenler üzerinde etkisiz olduğu belirlenmiştir.*

Sonuç: *Periodontal hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımına ilave olarak, özellikle kurkumin, kuersetin, luteolin, gallik asit ve apigenin içeren gıdaların tüketimi uygun ve yararlı olabilir. Bu yüzden, ileride, güçlü antimikrobiyal ve antioksidan potansiyeli olan fitokimyasalların periodontal patojenlerin inhibisyon mekanizmalarına yönelik etkilerinin daha detaylı araştırılması ve bu fitokimyasalların etkin kullanımlarını belirlemek için ileri boyutta in vivo çalışmalar yapılması önerilmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Gıda fitokimyasalları, kuersetin, periodontal patojenler, antimikrobiyal potansiyel*

ABSTRACT

Evaluation of In Vitro Antimicrobial Potentials of Dietary Phytochemicals Against Periodontal Pathogens

Objective: *In this study, it is aimed to investigate the antimicrobial potential of the dietary phytochemicals including quercetin, curcumin, apigenin, pyrogallol, gallic acid, luteolin and hydroxytyrosol against the periodontal pathogenic bacteria including Porphyromonas gingivalis ATCC 33277, Prevotella intermedia ATCC 25611 and Aggregatibacter actinomycetemcomitans ATCC 43718.*

Material and Methods: *The antimicrobial potential of the dietary phytochemicals was investigated by using agar well diffusion and microdilution methods. The antimicrobial activities of the phytochemicals were both studied at a concentration of 3 mg/ml and also in concentrations of 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.093, 0.046, 0.023 and 0.011 mg/ml using microdilution methods, respectively. Amoxicillin (20 µg/disc, 0.04-0.0015 mg/ml) and DMSO (≤10%) were tested as positive and negative controls, respectively.*

Results: *According to the results of this study, most of the phytochemicals had antimicrobial activity aganist all of the bacteria. The most effective phytochemical against pathogens was quercetin. The phytochemicals with the strongest antimicrobial potential were determined as quercetin, curcumin, luteolin, apigenin and gallic acid. In our study DMSO (≤4%, v/v) showed no antimicrobial effect on the pathogens.*

Conclusion: *In addition to the usage of antibiotics in the treatment of periodontal diseases, the consumption of the phytochemicals including especially curcumin, quercetin, luteolin, gallic acid and apigenin may be appropriate and helpful. Therefore, it is suggested that more detailed in vivo research about the inhibition mechanisms of the periodontal pathogens by potent phytochemicals should be performed and, further in vivo studies should be carried out to detect effective usage of these phytochemicals.*

Keywords: *Dietary phytochemicals, quercetin, periodontal pathogens, antimicrobial potential*

Alındığı tarih: 12.06.2017
Kabul tarihi: 22.08.2017

Yazışma adresi: Elif Burcu Bali, Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Gölbaşı, Ankara
e-posta: e.burcubali@gmail.com

[§]Bu çalışma Gazi Üniversitesi BAP birimi (Proje No: 21/2015-01) tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmanın bir bölümü TBD Biyokimya Günleri - Sivas 2016'da (2-5 Kasım 2016, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas) poster bildirisi olarak ve diğer bir bölümü Gıda, Metabolizma ve Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi'nde (28 Kasım 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, dişetinde inflamasyona, periodontal doku yıkımına ve alveolar kemik kaybına neden olan mikrobiyal, kronik, inflamatuvar hastalıklardır[1]. Dünyada yaygın ve yüksek oranda görülen hastalıklar olup, bu hastalıkların metabolik, aterosklerotik kardiyovasküler, romatizmal hastalıklar, aspirasyon pnömonisi gibi hastalıklara sahip duyarlı bireylerin sistemik sağlığına zarar verdiği bilinmektedir[2]. Bu hastalıklar *Porphyromonas gingivalis, Prevotella* sp. *Fusobacterium* sp. ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi polimikrobiyal enfeksiyon karakteri gösterebilen Gram negatif anaerop ve fakültatif bakteriler ile ilişkilidir[3-5]. Bu bakteriler, oksijen radikallerinin aşırı üretimini hızlandırarak kollajen ve periodontal doku yıkımına neden olabilmektedir. Antioksidanlar oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştırılmakta ve kollajen yıkımını engelleyebilmektedir. Yetersiz beslenme doğrudan periodontal hastalıklara neden olmasa da, yetersiz beslenen insanlarda bu hastalıkların daha ciddi görüldüğü düşünülmektedir[6]. Özellikle antioksidanca zengin meyve sebze gibi bitkisel kaynaklı besinlerde bulunan fitokimyasallar bu tür hastalık risklerini azaltmakla ilişkilendirilmektedir[7].

Türkiye'de toplam ilaç tüketimi içerisinde antibiyotikler %22'lik payla birinci sırada yer almaktadır[8]. Oral enfeksiyonların tedavisinde de yaygın olarak kullanılan çoğu antibiyotiğe karşı bakteriyel direnç oluşmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu dirençten kaynaklanan oral hastalık sıklığındaki artış mevcut tedaviye ilaveten, güvenli, etkili ve ekonomik ürünlerin kullanım gereksinimini doğurmaktadır. Bu hastalıklara karşı ticari olarak kullanılan kimyasal ajanlar olmasına rağmen, bunlar oral mikrobiyotayı değiştirebilmekte ve istenmeyen yan etkiler oluşturabilmektedir. Bu yüzden bitkilerden izole edilen doğal fitokimyasallar sentetik kimyasallara iyi birer alternatif olarak düşünülmektedir[4].

Bu araştırmada soğan, brokoli, elma, avakado, mango, muz, siyah çay maydanoz, zeytin yağı, lahana, havuç, hardal, biber ve turp gibi gıdalarda etken fitokimyasal olarak tüketilen, yüksek antioksidan etkili kuersetin, kurkumin, pirogallol, gallik asit, luteolin, hidroksitirozol ve apigeninin *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 patojenlerine karşı in vitro olarak antimikrobiyal potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Luteolin ve hidroksitirozolün mevcut patojenler üzerine antimikrobiyal potansiyelleri mikrodilüsyon yöntemiyle, ilk kez diğer fitokimyasalların aktiviteleri ile kıyaslanarak araştırılmıştır[9,10]. Buna ilaveten, çalışmamızda mevcut fitokimyasalların antimikrobiyal potansiyelleri agar kuyucuk yöntemiyle de ilk kez ortaya çıkarılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriler: Çalışmada kullanılan *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 periodontal patojenleri Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 ise ticari olarak satın alınmıştır.

Bakterilerin üretimi: Çalışmada kullanılan periodontal patojenlerden *P. gingivalis* ve *P. intermedia*, Fastidious Anaerob Agar (FAA Lab M, İngiltere) besiyerine %10 koyun kanı, %10 vitamin K ve hemin (BioMérieux, Fransa) solüsyonu ilave edilerek tam otomatik anaerob kabinde (Electrotek, İngiltere) %80 N_2, %10 H_2O, %10 CO_2 atmosfer ortamında 37°C'de 5-7 gün boyunca inkübe edilerek üretilmiştir. *A. actinomycetemcomitans* ise %10 at serumu, %10 vitamin K ve hemin solüsyonu ilave edilerek hazırlanmış Tryptic Soy Serum Basitrasin

Vankomisin agarda (TSBV, Merck, Almanya), %10 CO_2'li etüvde 4-5 gün süre ile üretilmiştir.

Fitokimyasalların hazırlanması: Çalışmada kullanılan kuersetin (Sigma, ABD), kurkumin (Sigma, ABD), apigenin (Sigma, ABD), pirogallol (Sigma, ABD), luteolin (Sigma, ABD), hidroksitirozol (Sigma, ABD) ve gallik asit (Merck, Almanya) ticari olarak satın alınmıştır. Pirogallol, hidroksitirozol ve gallik asit distile suda, diğer fitokimyasallar ise %10 dimetilsülfoksit (DMSO)'te çözülerek stok olarak hazırlanmıştır. Stoklar uzun vadede -20°C'de saklanmıştır.

Fitokimyasalların Antimikrobiyal Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

Agar difüzyon yöntemi: Fitokimyasalların patojenler üzerine antimikrobiyal aktivitesi anaerobik bakteriler üzerinde Koo ve ark.[11]'nın yaptığı agar difüzyon yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. Bu yönteme göre, %10 koyun kanı, %10 vitamin K ve hemin solüsyonu içeren "Fastidious Anaerob Broth" (FAB, Merck, Almanya) veya %10 at serumu, %10 vitamin K ve hemin solüsyonu içeren "Triptik Soy Broth" (TSB, Merck, Almanya) besiyeri içerisinde $1.5x10^8$ CFU/ml (0.5 Mc Farland) bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları eküvyon yardımıyla besiyerine ekilmiştir. Katı besiyerlerinde açılan kuyucuklara 100 μl, final konsantrasyonlardaki (3 mg/ml) fitokimyasallardan konulmuştur. *P. gingivalis* ve *P. intermedia* patojenleri anaerobik kabinde 37°C'de 5-7 gün, *A. actinomycetemcomitans* ise %10 CO_2'li etüvde 24-48 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak çözücü %10 DMSO, pozitif kontrol olarak amoksisilin (20 μg/disk) kullanılmıştır. Patojenlere karşı oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek bakteri üremeleri değerlendirilmiştir. Deney üç kez yinelenerek, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Mikrodilüsyon yöntemi: Fitokimyasalların patojen bakterilere karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri Zgoda ve ark.[12]'nın yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. Bu yönteme göre, 96 kuyucuklu mikroplaklara 100 μl besiyeri konulduktan sonra ilk kuyucuğa test edilecek fitokimyasalın başlangıç konsantrasyonu aynı hacimde eklenip ½ oranında seri dilüsyonlar (3-0.01 mg/ml) yapılmıştır. Sonrasında her bir kuyucuğa 100 μl bakteri süspansiyonları ($1.5x10^8$ CFU/ml) ilave edilmiş ve toplam hacim 200 μl'ye tamamlanmıştır. Kontrol grupları olarak ise kuyucuklara bakteri süspansiyonu, DMSO ve amoksisilin eklenmiştir. Bakteriler agar kuyucuk difüzyon yöntemindeki gibi inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda fitokimyasalların MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. MİK değeri büyümenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon, MBK ise hiçbir mikrobiyal üremenin görülmediği konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi en az iki tekrar çalışılmıştır.

İstatiksel analiz: İstatiksel analizler SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, ABD) istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalama sonuçlar arasındaki farklılıklar varyans analizi (ANOVA) ile belirlenerek ortalama değerler Tukey testi ile karşılaştırılmıştır. İstatiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

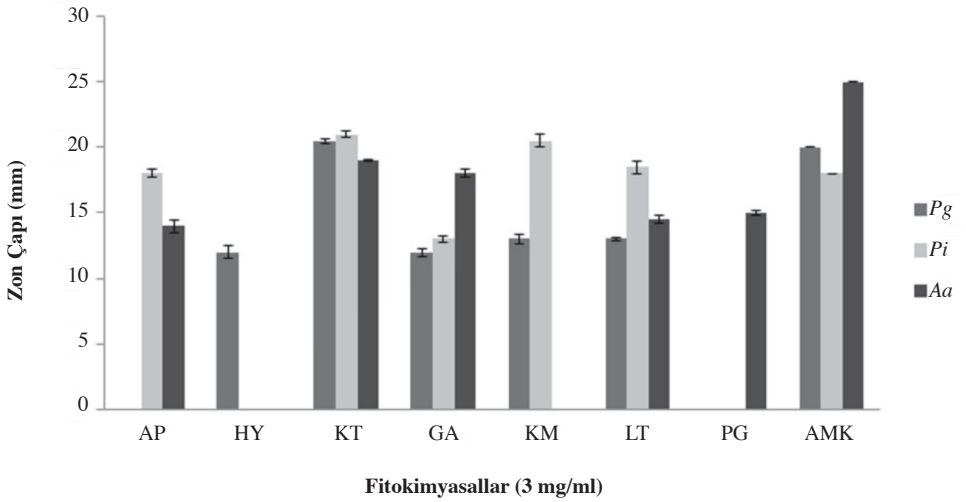
Çalışmada, agar kuyucuk difüzyon yönteminde, 3 mg/ml konsantrasyonda tüm fitokimyasalların *P. gingivalis, P. intermedia* ve/veya *A. actinomycetemcomitans* periodontal patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 1). Kuersetin *P. gingivalis, P. intermedia* ve *A. actinomycetemcomitans* patojenlerine karşı sırasıyla 20.50±0.20, 21.00±0.20 ve 19.00±0.10 mm zon çapıyla en iyi aktivite gösteren fitokimyasal olarak belir-

Tablo 1. Fitokimyasalların periodontal patojen bakterilere karşı oluşturduğu inhibisyon zonları (mm). Tablodaki sayılar üç tekrarlı deneyler sonucu elde edilen ortalama ± standart sapma (SD) değerleridir.

	Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Zon Çapları Ortalama ± SD (mm)		
Fitokimyasal (3 mg/ml)	***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277**	***Prevotella intermedia* ATCC 25611**	***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718**
Apigenin	-	18.00±0.30	14.00±0.50
Hidroksitirozol	12.00±0.50	-	-
Kuersetin	20.50±0.20	21.00±0.20	19.00±0.10
Gallik asit	12.00±0.30	13.00±0.20	18.00±0.30
Kurkumin	13.00±0.40	20.50±0.50	-
Luteolin	13.00±0.10	18.50±0.50	14.50±0.30
Pirogallol	-	-	15.00±0.20
%10 DMSO (Çözücü)	-	-	-
Amoksisilin (20 μg/disk)	20.00±0.10	18.00±0.20	25.00±0.10

lenmiştir. Sonrasında *P. gingivalis* patojenine karşı diğer fitokimyasalların antimikrobiyal etkileri sırasıyla luteolin, hidroktirozol, kurkumin ve gallik asit olarak belirlenmiş, pirogallol ve apigeninin ise bu bakteriye karşı antimikrobiyal aktivitesi görülmemiştir. *P. gingivalis* patojeni için hidroktirozol ve gallik asit zon çaplarında anlamlı bir farklılık bulunmazken, kuersetin, kurkumin ve luteolin zon çaplarında anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0.05$). *P. intermedia* patojenine karşı kuersetinden sonra diğer fitokimyasalların antimikrobiyal etkileri ise sırasıyla kurkumin, luteolin, apigenin ve gallik asit olarak belirlenmiştir. Hidroksitirozol ve pirogallol için antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır. *A. actinomycetemcomitans* patojeninde ise diğer fitokimyasalların antimikrobiyal etkileri sırasıyla gallik asit, pirogallol, luteolin, apigenin, kurkumin ve hidroktirozol olarak belirlenmiştir. *P. intermedia* ve *A. actinomycetemcomitans* patojenleri için her bir fitokimyasalın oluşturduğu zon çapları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Çalışmada, amoksisilin (20 μg/disk) antibiyotiği patojenler üzerinde farklı antimikrobiyal aktivite gösterirken, %10 DMSO'nun bakteriler üzerinde antimikrobiyal bir etkinliği belirlenmemiştir. Kuersetin, kurkumin, luteolin, apigenin ve gallik asit patojenler üzerinde antimikrobiyal potansiyeli en iyi olan fitokimyasallar olarak saptanmıştır. En zayıf antimikrobiyal potansiyeli olan fitokimyasallar ise hidroksitirozol ve pirogallol olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

Çalışmada tüm fitokimyasaların *P. gingivalis*, *P. intermedia* ve *A. actinomycetemcomitans* patojenlerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenmiştir. Kuersetinin mikrodilüsyon testinde de patojenlere karşı en etkili fitokimyasal olduğu belirlenmiştir. *P. intermedia* için kurkumin ve kuersetinin antimikrobiyal potansiyelleri (MİK ve MBK) eş değer bulunmuştur (Tablo 2). *P. gingivalis* için ise kuersetinden sonra en yüksek antimikrobiyal aktivite luteolin olarak belirlenmiştir. Hidroksitirozol, gallik asit ve kurkuminin MİK (0.75 mg/ml) ve MBK (1.5 mg/ml) değerleri aynı bulunmuştur. Pirogallol ve apigenin ise en düşük antimikrobiyal aktiviteli fitokimyasallar olarak belirlenmiştir. *P. gingivalis* için apigenin, kuersetin, luteolin ve pirogallolün mikrodilüsyon sonuçları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0.05$). Çalışmada *P. intermedia* patojenine karşı ise kuersetin ve kurkuminden sonra antimikrobiyal etkinlik sırasıyla luteolin>apigenin>gallik asit> pirogallol olarak belirlenmiştir. Hidroksitirozolun 3-0.01 mg/ml doz aralığında *P. intermedia* patojenine karşı antimikrobiyal etkinliği saptanmamıştır. *A. actinomycetemcomitans* patojeni için ise, kuersetinden sonra diğer fitokimyasalların



Şekil 1. Agar kuyucuk yöntemine göre fitokimyasalların oluşturduğu zon çapları (mm). Pg: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, Pi: *Prevotella intermedia* ATCC 25611, Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718. AP: Apigenin, HY: Hidroksitirozol, KT: Kuersetin, GA: Gallik asit, KM: Kurkumin, LT: Luteolin, PG: Pirogallol, AMK: Amoksisilin (20 μg/ml).

Tablo 2. Gıda fitokimyasallarının periodontal patojenler için MİK ve MBK Değerleri (mg/ml).

		Porphyromonas gingivalis ATCC 33277		*Prevotella intermedia* ATCC 25611		*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718	
Fitokimyasal	**Test Aralığı (mg/ml)**	**MİK**	**MBK**	**MİK**	**MBK**	**MİK**	**MBK**
Apigenin	3-0.01	3	3	0.375	0.75	1.5	1.5
Hidroksitirozol	3-0.01	0.75	1.5	>3	>3	>3	>3
Kuersetin	3-0.01	0.187	0.375	0.046	0.093	0.046	0.093
Gallik asit	3-0.01	0.75	1.5	0.75	1.5	0.187	0.375
Kurkumin	3-0.01	0.75	1.5	0.046	0.093	>3	>3
Luteolin	2-0.01	0.5	1	0.125	0.25	0.5	1
Pirogallol	3-0.01	3	3	3	3	0.375	0.75
DMSO (%)	32-0.50	4	8	4	8	4	8
Amoksisilin (mg/ml)	0.04-0.0015	0.01	0.01	0.005	0.005	0.01	0.01

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu, MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyonu

antimikrobiyal etkinlikleri sırasıyla, gallik asit>pirogallol>luteolin> apigenin olarak bulunmuştur. Hidroksitirozol ve kurkuminin kullanılan doz aralığında (3-0.01 mg/ml) bu patojen üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır. Çalışmada, %4 ve daha alt dozlardaki DMSO'nun patojenler üzerinde inhibisyon etkisi bulunmamıştır. Patojenlerin antibiyotik duyarlılıkları ise *A. actinomycetemcomitans* < *P. gingivalis* < *P. intermedia* olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Fitokimyasallar, sebze, meyve, tane, tahıl, baklagil, baharat gibi gıdalarda bulunan tek başına besin özelliği taşımayan kimyasal maddelerdir[13]. Bu maddeler açısından zengin beslenmenin kanser, inflamasyon, kardiyovasküler ve metabolik hastalık risklerini azalttığı bilinmektedir[14]. Bunlar antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı enfeksiyon hastalıklarına karşı da kullanılmaktadır[15]. Ülkemizde yapılmış olan bitkisel kökenli

bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili Akkoç ve ark.[16] ve Şimşek[17]'in yaptığı çalışmalarda, bitkisel kökenli ilaçlara karşı mikroorganizmaların direnç geliştirmesinin daha zor olduğu, bitkisel ürünlerin tedavi amaçlı kullanım maliyetinin kimyasal ilaçlara göre daha düşük olduğu, sentetik kökenli maddelerin vücut üzerine olumsuz etkilerinin bitkisel ürünlerin kullanımı ile azalabileceği veya ortadan kaldırılabileceği belirtilmiştir. Bu nedenlerden dolayı bitkisel bileşiklerin antimikrobiyal tedavilerdeki başarısı ve/veya koruyucu rolüne yönelik yapılan çalışmaların ülkemizde gittikçe önem kazandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda ise, periodontal patojenlerine karşı gıdalarda etken madde olarak bulunan fitokimyasalların (kuersetin, kurkumin, apigenin, pirogallol, gallik asit, luteolin ve hidroksitirozol) in vitro antimikrobiyal potansiyelleri ortaya çıkarılmıştır. Literatürde çalışmamızda kullanılan bazı fitokimyasalların (kuersetin, kurkumin, pirogallol, gallik asit ve/veya apigenin) bazı periodontal patojenler ve karyojenik bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitesini gösteren çalışmalar mevcuttur[18,19-24]. Kuersetin ve kurkumin fitokimyasallarının periodontal patojenler üzerine antimikrobiyal aktivitesi önceden farklı araştırmacılar tarafından[17-22,24] belirlenmiş olmasına rağmen, çalışmamızdaki luteolin ve hidroksitirozol fitokimyasallarının antimikrobiyal potansiyelleri mevcut periodontal patojenler için ilk kez araştırılmıştır.

Çalışmamızda, tüm periodontal patojenler üzerinde en etkili fitokimyasal hem agar kuyucuk difüzyon hem de mikrodilüsyon yönteminde kuersetin olarak belirlenmiştir. Literatürde diğer araştırmacıların[18-20] yaptıkları çalışmalarda da, *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans* suşları üzerinde kuersetinin antimikrobiyal etkinliği belirlenmiş ve araştırmacıların deney sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumlu bulunmuştur. Shu ve ark.[20]'nın yaptığı çalışmada, kuersetinin *P. intermedia* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi (MİK: 4 mg/ml, MBK: 16 mg/ml), bulduğumuz deney sonucundan (MİK: 0.046 mg/ml, MBK: 0.093 mg/ml) farklılık göstermektedir. Bu araştırmacılar, kuersetinin antimikrobiyal etkinliğini agar dilüsyon yöntemiyle saptamışlardır. Bu nedenle deney sonuçları arasındaki farklılığın özellikle kullanılan yöntem farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Izui ve ark.[24]'nın periodontopatojen bakterileri üzerinde kurkuminin doza bağlı olarak antibakteriyel etkili olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda da, *A. actinomycetemcomitans* hariç diğer patojenler üzerinde kuersetinden sonra en iyi antimikrobiyal potansiyeli olan fitokimyasallarından birinin kurkumin olması araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Savita ve ark.'nın[22] yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, kurkumin, *A. actinomycetemcomitans* bakterisinin başka bir suşunda (ATCC 29523) mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite (MİK: 0.2 µg/ml) gösterirken, kullandığımız suş (ATCC 43718) üzerinde 3 mg/ml konsantrasyonda etkili olmamıştır. Ayrıca çalışmamızda kullanılan bakteri suşları üzerine kuersetin, kurkumin, pirogallol, gallik asit ve apigeninin mikrodilüsyon sonuçları diğer araştırmacıların[18-20,23,24] buldukları sonuçlardan da farklılık göstermektedir. Bu durum deneysel koşulların farklılığı, aynı türün farklı suşlarının farklı özellikler göstermesi gibi nedenlerden kaynaklanabilir.

Çalışmamızda, bakteriler üzerinde DMSO'nun etkisi de test edilmiş, %4 ve altındaki DMSO konsantrasyonlarının bakterileri inhibe edici bir etkisinin olmadığı görülmüştür[9]. Bu sonuçlar, Porto ve ark.[25]'nın yapmış olduğu çalışmayla uyumlu bulunmuştur. Literatürde periodontal patojenlerin farklı suşlarıyla yapılmış diğer araştırmalarda[18,26,27] farklı orandaki (%1, %2.5 ve %10) DMSO konsantrasyonlarının bu bakteriler üzerinde etkisiz olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, 3 mg/ml konsantrasyonundaki apigenin ve pirogallol *P. gingivalis* ve/veya *P. intermedia* karşı agar kuyucuk difüzyon yönteminde antimikrobiyal aktivite göstermezken, mikrodilüsyon yönteminde aynı dozda bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkili bulunmuştur. Literatürdeki[28,29] periodontal ve oral patojen bakterilerin antimikrobiyal aktivite sonuçlarında da bulgularımızdaki gibi farklılıklar mevcuttur. Diğer araştırmacıların[28,29] bulgularına paralel olarak çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlar mikrodilüsyon yönteminin agar kuyucuk yöntemine göre daha güvenilir olduğunu göstermektedir. Çünkü bu iki yöntem arasındaki farklılık, fitokimyasalların agar ortamının içeriğine bağlanarak bu ortamda difüzyonlarının sınırlanabilmesinden, sıvı koşullarda ise mikrobiyal hücrelerin fitokimyasallar ile direkt temas etmesinden dolayı olabilir. Dolayısıyla mikrodilüsyon yöntemi agar difüzyona göre daha kesin sonuç verebilir.

Periodontal hastalıkların patogenezinde birçok mikroorganizma türü tarafından oluşturulan biyofilm tabakası birincil etken olduğundan bu hastalıkların tedavisinde amoksisilin, amoksisilin-metronidazol ve amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonu gibi geniş etki spektrumlu antibiyotikler yeğlenmektedir[30,31]. Çalışmamızdan elde edilen veriler fitokimyasalların patojenler üzerine amoksisilin antibiyotiği kadar düşük dozlarda etkin olmasa da belirgin bir antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu in vitro olarak ortaya koymaktadır. Bu nedenle periodontal hastalıkların tedavisinde, bu fitokimyasalları içeren gıdaların tüketiminin antibiyotik tedavisine ilave edilmesinin uygun ve yararlı olacağı düşünülmektedir.

Dental biyofilm gelişiminin kontrolü periodontal hastalık oluşumunu önleyebilir. Dental biyofilm oluşumunun engellenmesinde fenol türevleri ve doğal bileşikler de etkili olmaktadır[32]. Yamanaka ve ark.[33], yaban mersinin polifenol fraksiyonlarının *Porphyromonas gingivalis* patojeni üzerine antibiyofilm etkisini araştırmış ve bu fraksiyonların bu patojen üzerinde önemli oranda antibiyofilm etkili olduğunu saptamışlardır. Gursoy ve ark.[34] ise *Satureja hortensis* L. uçucu yağının periodontal bakteriler üzerinde kullanılan diğer uçucu yağlara göre daha güçlü bir antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Teanpaisan ve ark.[35] ise Hindistan ve Tayland'da tropik alanlarda yaygın bulunan *Artocarpus lakoocha* bitki ekstresinin doza ve zamana bağlı olarak oral biyofilmi eradike edebildiğini saptayarak, bu ekstrenin oral patojenler üzerinde potansiyel bir antibiyofilm ajanı olarak rol oynadığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, literatürde bulunan bitkisel kökenli bileşiklerin periodontal patojenlere karşı in vitro antimikrobiyal ve antibiyofilm çalışmalarına ilave olarak, çalışmamızda kullanılan gıda kaynaklı fitokimyasalların periodontal patojenlerin inhibisyon mekanizmalarına yönelik etkilerinin ileride daha detaylı araştırılması ve buna ilaveten periodontal hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde bu fitokimyasalların etkin kullanımlarını belirlemek için daha ileri boyutta hücresel düzeyde in vivo çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Teşekkür

Bu araştırmanın gerçekleşmesine finansal destek veren Gazi Üniversitesi BAP birimine (Proje No: 21/2015-01) proje yürütücüsü ve araştırmacıları olarak teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Secerli Dürer T. Periodontal hastalıklar. Barnat. 2014;8(1):34-7.
2. Buset SL, Walter C, Friedmann A, Weiger R, Borgnakke WS, Zitzmann NU. Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. J Clin Periodontol. 2016;43(4):333-44. https://doi.org/10.1111/jcpe.12517
3. Doğan M, Baysal B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Mikrobiyol Bul. 2010;

44(2):211-9.
4. Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:680354 . https://doi.org/10.1093/ecam/nep067
5. Gürcan Ş, Ünlü S, Kuloğlu F, Karadenizli A, Kuşkucu M. Aggregatibacter actinomycetemcomitans kaynaklı olası enfektif endokardit olgusuna mikrobiyolojik yaklaşım. Mikrobiyol Bul. 2016;50(2):315-21. https://doi.org/10.5578/mb.10803
6. Bhuvaneswari P. Antioxidants in oral healthcare. J Pharm Sci & Res. 2014;6:206-9.
7. Çiçek B. Fitokimyasallar ve immün sistem. Turkiye Klinikleri J Nutr Diet-Special Topics. 2016;2(2):36-41.
8. Göncüoğlu M. Patojen bakterilerde antibiyotik direnç profili. Turkiye Klinikleri J Vet Sci. 2012;3(3):77-83.
9. Bali EB, Akca, G, Erdönmez, D, Erkan Türkmen, K, Sağlam, N. Gıdalardaki fitokimyasalların periodontal patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin in vitro değerlendirilmesi. Gıda, Metabolizma&Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi, 28 Kasım 2016, İstanbul. Kongre Kitabı, 2016:34-8.
10. Bali EB, Akca G, Erkan Türkmen K, Erdönmez D, Sağlam N. Gıda (Poli) fenollerinin periodontal patojen *Prevotella intermedia* ATCC 25611 üzerine inhibisyonu. Turk J Biochem. 2016;41(Suppl 3):P035.
11. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000;45(2):141-8. https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00117-X
12. Zgoda J, Porter J. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. Pharm Biol. 2001;39(3):221-5. https://doi.org/10.1076/phbi.39.3.221.5934
13. Dündar Y. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. Kocatepe Tıp Derg. 2001;2(2):131-8.
14. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. Curr Opin Food Sci. 2016;8:33-42. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002
15. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. J Dent. 2009;37(6):413-23. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.003
16. Akkoc N, Akcelik M, Haznedaroglu IC, et al. In vitro anti-bacterial activities of Ankaferd medicinal plant extract. Turk Klinikleri J Med Sci. 2009;29(2):410-5.
17. Şimşek M. Arum dioscoridis ekstrelerinin çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi. Turk J Clin Lab. 2013;4(1):66-70.
18. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards CA, Ramage G, Combet E. Selected dietary (poly) phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. Food Funct. 2015;6(3):719-29. https://doi.org/10.1039/C4FO01087F
19. Geoghegan F, Wong R, Rabie A. Inhibitory effect of quercetin on periodontal pathogens in vitro. Phytother Res. 2010;24(6):817-20.
20. Shu Y, Liu Y, Li L, et al. Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens. Afr J Microbiol Res. 2011;5(30):5358-61.
21. Mohammed NA, Habil NY. Evaluation of antimicrobial activity of curcumin against two oral bacteria. ACIS. 2015;3(2-1):18-21. https://doi.org/10.11648/j.acis.s.2015030201.14
22. Savita AM, Dawra C, Bhat K. An in vitro evaluation of antibacterial activity of curcumin against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. World J Dent. 2015;6(1):16-9. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10015-1306
23. Cha S-M, Kim G-U, Cha J-D. Synergistic antimicrobial activity of apigenin against oral pathogens. IJOER. 2016;2(1):27-37.
24. Izui S, Sekine S, Maeda K, et al. Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria. J Periodontol. 2016;87(1):83-90. https://doi.org/10.1902/jop.2015.150260
25. Porto TS, Rangel R, Furtado NA, et al. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. Molecules. 2009;14(1):191-9. https://doi.org/10.3390/molecules14010191
26. Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of *Aloe vera* gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. J Oral Sci. 2012;54(1):15-21. https://doi.org/10.2334/josnusd.54.15
27. Herrera Herrera A, Franco Ospina L, Fang L, Díaz Caballero A. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus* mutans to antibacterial effect from *Mammea americana*. Adv Pharmacol Sci 2014;2014:384815.
28. Shafiei Z, Shuhairi NN, Md Fazly Shah Yap N, Harry Sibungkil C-A, Latip J. Antibacterial activity of *Myristica fragrans* against oral pathogens. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:825362. https://doi.org/10.1155/2012/825362
29. Shetty S, Thomas B, Shetty V, Bhandary R, Shetty RM. An in-vitro evaluation of the efficacy of garlic extract as an antimicrobial agent on periodontal pathogens: A microbiological study. Ayu. 2013;34(4):445-51. https://doi.org/10.4103/0974-8520.127732
30. Gümüş P, Buduneli N. Antibiyotikler periodontal tedavide ne zaman ve nasıl kullanılmalı? Balikesir Saglik Bil Derg. 2014;3(2):122-5.
31. Tüter G. Periodontal tedavide antibiyotiklerin kullanımı. GÜ Dişhek Fak Derg 2006;23(1):55-9.
32. Tardugno R, Pellati F, Iseppi R, Bondi M, Bruzzesi G, Benvenuti S. Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. Nat Prod Res. 2018;32(5):544-51. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1329730
33. Yamanaka A, Kouchi T, Kasai K, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res. 2007;42(6):589-92. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00982.x
34. Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, Cakmakci L, Könönen E, Uitto V-J. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. Anaerobe. 2009;15(4):164-7. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.02.004
35. Teanpaisan R, Senapong S, Puripattanavong J. In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. Trop J Pharm Res. 2014;13(7):1149-155. https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.20

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):29-37
doi:10.5222/TMCD.2018.029

Araştırma

Avcı Bakteri *Bdellovibrio bacteriovorus* Hücre Özütünün Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi

Melek ÖZKAN, Hilal YILMAZ
Gebze Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Gebze, Kocaeli

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada Gram negatif bakterileri besin olarak kullanan Gram-negatif avcı bir bakteri olan Bdellovibrio bacteriovorus hücre özütünün, aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı temizleme ve biyofilm oluşumunu engelleme etkisi incelenmiştir.*

Gereç ve Yöntem: *Farklı pH, sıcaklık ve mineral konsantrasyonlarının B. bacteriovorus'un aktivitesine olan etkisi incelenmiştir. B. bacteriovorus hücre özütünün atıksu bakterilerine ait biyofilm oluşumunu engelleme etkisi 96 kuyucuklu polisitren plakalar kullanılarak kristal viyole yöntemiyle ölçülmüştür. B. bacteriovorus'un hücre özütünün filtrasyon membranı üzerinde oluşan biyofilm tabakayı temizleme etkisi ölü uçlu reaktor sistemi kullanılarak ölçülmüştür.*

Bulgular: *8-8.8 pH, 29.5°C sıcaklık ve 5 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $MgCl_2$ mineral konsantrasyonlarının B. bacteriovorus aktivitesi için optimum olduğu bulunmuştur. B. bacteriovorus hücre özütünün çamur bakterilerine ait biyofilm oluşumunu engelleme etkisi %39 olarak ölçülmüştür. Atıksu filtrasyonunda kullanılmış membran üzerinde birikmiş olan biyofilm tabaka B. bacteriovorus hücre özütü ile yıkanmış ve bu uygulamanın membran performansına etkisi ölçülmüştür. Tamponla yıkanan kontrol membranına kıyasla B. bacteriovorus hücre özütü ile yıkanan membran akısında 12.44 $L.m^{-2}.sa^{-1}$'lik iyileşme gözlemlenmiştir.*

Sonuç: *Litik enzimlere sahip olan B. bacteriovorus hücre özütünün farklı materyaller üzerinde istenmeyen biyofilm oluşumunu engelleyebileceği gösterilmiştir.*

Anahtar kelimeler: *Bdellovibrio bacteriovorus, biyofilm giderimi, litik enzimler*

ABSTRACT

Biofilm Inhibition Effect of Cell Extracts of Bdellovibrio bacteriovorus, a Predator Bacterium

Objective: *In this study, cell extract of Bdellovibrio bacteriovorus, a Gram-negative predator bacterium that feeds on other gram negative bacteria was investigated for its potential for eradicating or inhibiting biofilm formation by active wastewater bacteria.*

Material and Methods: *The effect of several pH, temperature and mineral concentrations on the activity of B. bacteriovorus was investigated. The inhibition effect of B. bacteriovorus cell extract on biofilm formation by wastewater bacteria was measured by crystal violet method using 96 well polystrene plates. Cleaning effect of cell extracts of B. bacteriovorus on biofilm layer formed on filtration membrane was measured by using fouled membrane and dead- end reactor system.*

Results: *It was found that 8-8.8 pH, 29.5°C temperature and mineral concentrations of 5 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $MgCl_2$ are optimum for B. bacteriovorus to acquire highest activity. The effect of B. bacteriovorus cell extract to inhibit the biofilm formation by sludge bacteria was measured to be 39%. When the biofilm layer accumulated on the surface of filtration membrane used for wastewater filtration was cleaned by B. bacteriovorus cell extract, an improvement of 12.44 $L.m^{-2}.sa^{-1}$ was observed in the flux of membrane as compared to the control that was cleaned by buffer.*

Conclusion: *The results show that B. bacteriovorus cell extract which is rich in lytic enzymes can be used for inhibition or cleaning of undesired biofilm layer formed on different surfaces.*

Keywrds: *Bdellovibrio bacteriovorus, biofilm inhibition, lytic enzymes*

GİRİŞ

Biyofilmler, kendi ürettikleri polimerik jelsi bir tabaka sayesinde bir yüzeye tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu yapı olarak tanımlanabilir. Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen, "hücre dışı polimerik yapı", "ekzopolisakarit" ya da "ekzopolimer (EPS)" olarak adlandırılan polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır. Biyofilm kümelerinin %97'lik kısmı sudan

Alındığı tarih: 14.06.2017
Kabul tarihi: 20.12.2017
Yazışma adresi: Melek Özkan, Gebze Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Gebze / Kocaeli
e-posta: mozkan@gtu.edu.tr

meydana gelmektedir. Diğer bileşenler ise %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir[1]. Biyofilm hücrelerinin yüzeye tutunmasına polisakkaritler, proteinler, DNA ve ekstraselüler martriks yardımcı olmaktadır. Biyofilmler bazı biyoteknolojik uygulamalarda yararlı olmasına karşın birçok teknolojide sorun yaratan istenmeyen bir oluşumdur. Atıksu arıtım teknolojilerinin bazı uygulamalarında biyofilm oluşumuna gereksinim duyulsa da biyomateryaller, gemi gövdeleri, membranlar, su boruları gibi yapılar üzerinde oluşan biyofilm tabaka hem sağlık hem de ekonomik açıdan sorun oluşturmaktadır. İnsan vücudunda kataterler, kontakt lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı akciğer dokusu gibi canlı ve cansız çoğu alanda biyofilmlere rastlanılmaktadır[2]. Araştırmalar nozokomiyal enfeksiyonların ortalama %65'ine mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin neden olduğunu ve bu durumun tedavi masraflarının artmasına neden olduğunu göstermektedir[3]. Biyofilm oluşumunun sorun yarattığı durumlardan biri de membran biyoreaktörlerde kullanılan membranların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakanın yarattığı kirlenmeye bağlı tıkanma (fouling) sorunudur. Membran biyoreaktör (MBR) teknolojisi aktif çamurdaki biyolojik parçalanma prosesi ile direkt olarak katı-sıvı ayrımı işlemini membran filtrasyonu kullanarak birleştiren bir teknolojidir. MBR sistemi mikro veya ultrafiltrasyon membran teknolojilerinin kullanımıyla (por büyüklüğü 0.05-0.4 μm arasında değişen) bakteri floklarının ve askıdaki katıların fiziksel olarak biyoreaktörde kalmasını sağlar. Bu uygulama sırasında membranların yüzeyinde biriken katı partiküller ve mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm tabaka zamanla membranın tıkanmasına neden olmaktadır.

Son yıllarda, membranların temizlenmesi için kullanılan çeşitli fiziksel ve kimyasal uygulamaların yanı sıra yeni yaklaşımlar da geliştirilmektedir. Titreşimli elektriksel alanlar; düşük voltaj (-0.5 ile 5 volt arasında) elektriksel uyarımların uygulanması, fiziksel ve kimyasal yüzey modifikasyonları, nitrik oksit kullanımı, yeni yaklaşımlar arasında sayılabilir[4]. Biyofilm giderimi amacıyla a biyolojik yöntemlerin de temizleme potansiyeli araştırılmaktadır. Quorum sensing mekanizmasının inhibisyonu, EPS'nin enzimatik bozulması, bakteri hücre duvarının enzimatik olarak parçalanması ve bakterileri parçalayan bakteriyofajların kullanılmasına dayalı uygulamalar bu yöntemler arasında sayılabilir[5].

Bdellovibrio bacteriovorus Gram negatif bakterilerle beslenen avcı bir bakteridir ve bakteriyel popülasyonların dengesini sağladığı için özellikle çevre açısından önemli bir bakteri cinsidir. Daha önce yapılan çalışmalarda *B. bacteriovorus*'un parçalama aktivitesi çoğunluğu patojenik olan birçok Gram negatif bakteri üzerinde gösterilmiştir[6]. Bu patojenler tarafından oluşturulan biyofilmlerin de *B. bacteriovorus* tarafından başarılı bir şekilde parçalandığı rapor edilmiştir.

Bdellovibrio bacteriovorus yalnızca canlı değil ayrıca ölü hücreleri de parçalarlar[7]. Stolp et al. [8] *B. bacteriovorus*'un *Salmonella, Escherichia coli, Proteus, Pseudomonas, Serretia* gibi Gram negatif bakterileri tükettiğini göstermiştir.

Bdellovibrio bacteriovorus'un dişlerde periodontitis hastalığına neden olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ı parçaladığı ve oluşturduğu biyofilm tabakayı bozduğu rapor edilmiştir[9]. *Alcaligenes, Campylobacter, Erwinia, Escherichia, Helicobacter, Pseudomonas, Legionella, Shigella* türleri ve *Helicobacter pylori* bakterisinin *B. bacteriovorus* tarafından parçalandığı Markelova[10] tarafından gösterilmiştir. Bu konuda çalışmaları bulunan Markelova, bu bakterinin biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyeli üzerinde durmuştur. *B. bacteriovorus* istila sırasında av olan hücrenin yapısında

önemli değişikliklere neden olur. Bu değişikliklerin hepsi tam olarak bilinmemektedir.

Avcı hücre avının dış zarını ve peptidoglikan tabakayı öncelikle yapıyı parçalamadan modifiye eder, modifikasyonda glikanazlar, deasetilazlar, peptidazlar ve lipopolisakkaridazlar rol oynar[11,12]. Modifikasyon ve saldırı istila edilen hücrenin şeklini ve diğer karakteristik özelliklerini değiştirir ve hücre yuvarlaklaşıp şişmeye başlar[13]. *B. bacteriovorus* avın iç zarını da modifiye eder, böylece degredatif enzimlerin ve parçalanmış materyallerin av ve avcı sitoplazması arasındaki transferi sağlanır[14-17].

Bdellovibrio bacteriovorus'un avını öldürmek için proteaz ve nukleaz gibi ekstraselüler enzimler salgıladıkları bilinmektedir[16]. Penetrasyon mekanizmasını detaylı inceleyen Burnham et al.[18], konakçı veya av olan hücrenin parçalanabilmesi için hem fiziksel hem de enzimatik aktivitenin işlevinin olduğunu belirtmişlerdir.

Aktif *B. bacteriovorus* kültürü ve aynı zamanda kültür supernantının (çöktürme veya filtrasyonla hücrelerden arındırılmış) bir alg türü olan *Oscillatoria* hücrelerini parçalayabildiği Burnham et al.[19] tarafından yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu parçalanmaya büyük ölçüde *B. bacteriovorus*'un salgıladığı enzimler neden olmaktadır. Parçalanmayı sitoplazmik hücre içeriğinin kaybı ve hücre duvarının çözünmesi takip etmektedir.

Bu çalışmada, *B. bacteriovorus* hücre içi enzimlerine sahip olan hücre özütünün biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli araştırılmıştır. Filtrasyon membranı yüzeyinde oluşan biyofilm tabakanın çözünmesine olan etkisi ölü uçlu reaktör sisteminde yapılan membran akı çalışmaları ile gösterilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi

Escherichia coli S17 ve *B. bacteriovorus* Nottingham Universitesi (İngiltere) öğretim üyesi Dr. Liz Sockett'ten sağlanmıştır. *E. coli* S17, *B. bacteriovorus*'un üretimi için av bakteri olarak kullanılmıştır. Hücreler nutrient agar [NA (maya özütü 3 g/L, pepton 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L)] üzerinde üretilip saklanmıştır. *E. coli* hücreleri bir gün önceden NA'a ekilmiştir. Daha sonra hücreler toplanarak HM tamponuna (10 mM Hepes, 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ pH:7.2), OD_{600} absorbans değeri 0.3-0.4 olacak şekilde eklenmiştir. Önceden üretilmiş olan *B. bacteriovorus* hücreleri bu karışıma eklenmiştir. Hücreler 29°C'de 180 rpm'de çalkalanarak 2-3 gün inkübasyona bırakılmış, absorbans değerindeki azalma (0.1-0.05 civarına düşüş) *B. bacteriovorus* hücrelerinin *E. coli* hücrelerini parçaladığını göstermektedir. Hazırlanan her yeni kültür ile birlikte bir kontrol kültürü de başlatılmıştır. Kontrol kültürüne aynı miktarda *E. coli* eklenmiştir ancak *B. bacteriovorus* yerine aynı hacimde tampon eklenmiştir. *B. bacteriovorus*'un hücre parçalama aktivitesi denklem 1'de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

Denklem 1: *Bdellovibrio bacteriovorus*'un hücre parçalama aktivitesinin hesaplanması

$$\left(\begin{matrix}\%\ B.bacterivorus \\ \text{hücre parçalama aktivitesi}\end{matrix}\right) = \frac{\left(\begin{matrix}\text{kontrol} \\ \text{biyokütlesi}\end{matrix}\right)_t - \left(\begin{matrix}B.bacteriovorus \\ \text{biyokütlesi}\end{matrix}\right)_t}{\left(\begin{matrix}\text{kontrol} \\ \text{biyokütlesi}\end{matrix}\right)_t} x\ 100$$

Sıcaklık, pH ve Mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi

Bdellovibrio bacteriovorus hücrelerinin av hücrelerini parçalamaları için uygun koşulların saptanması amacıyla, inkübasyon sıcaklığı, besiyeri pH'sı ve $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ minerallerinin konsantrasyonları değiştirilmiştir. Hücrelerin olağan koşullarda üretildiği HM tamponu 10 mM

Hepes, 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ içermektedir ve pH 7.2'dir. $MgCl_2$ konsantrasyonu 0.001-1 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda ve $CaCl_2$ konsantrasyonu 0.1-10 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda, ayrıca pH 7-8.8 arasında değişen 7 farklı pH değerinde HM tamponları hazırlanmıştır. *B. bacteriovorus* ve av hücre *E. coli* "Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi" başlığı altında verildiği şekilde besiyerlerine ekilerek üretim gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık deneyi için HM tampon içeriği değiştirilmeden inkübatör sıcaklığı 26°C, 29°C, 32°C, 35°C olacak şekilde ayarlanarak hücreler üretilmişlerdir. Deney sonunda *B. bacteriovorus* aktivitesi Denklem 1'de verildiği gibi hesaplanmıştır.

Bdellovibrio bacteriovorus Hücre Özütünün Hazırlanması

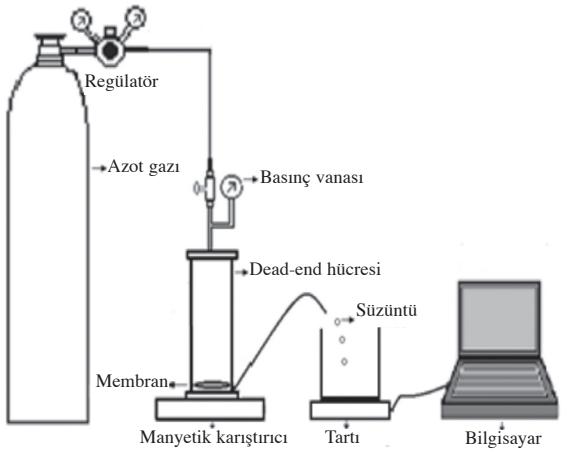
Bdellovibrio bacteriovorus hücre özütünün 1982'de von Stein ve ark.[21] tarafından kullanılan prosedür modifiye edilerek hazırlanmıştır. *B. bacteriovorus* kültürü 0.45 μm porlu steril filtreden geçirilmiş *E. coli* hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra 7000 rpm'de 20 dk çöktürülmüştür. Pellette toplanan hücreler PBS tamponunda (pH: 7.2; 1X NaCI 8 g/L, KCI 0.2 g/L, Na_2HPO_4 1.44 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L) çözüldükten sonra 90 W güce ayarlanmış sonik hücre parçalayıcı homojenizatör (Hielsher, Almanya) aracılığıyla buzda tutularak parçalanmıştır (1 dk. homojenizasyon, 1 dk. buzda bekletme, 30 yineleme). Parçalanmış hücre solusyonu 10000 rpm'de 10 dk. çöktürülerek hücre kalıntılarının çökmesi sağlanmıştır. Enzimlerce zengin supernatant kısmı -30°C'de saklanmıştır.

Bdellovibrio bacteriovorus'un Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi

Aktif çamur tankından alınan numunenin beher içinde 5 dk. çökmesi beklenmiştir. Daha sonra üstteki supernatant alınmıştır. 190 μl supernatant, 40 μl *B. bacteriovorus* hücre özütü olacak şekilde birbirine karıştırılarak 96 kuyucuklu polisitren plakalara eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına *B. bacteriovorus* hücre özütü yerine 40 μl tampon ilave edilmiştir. Deney 30°C'de 3 saat inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Üç saat sonunda 2 kez çeşme suyuyla yıkanan plaklar kurutulduktan sonra plakalarda oluşan biyofilm miktarı kristal viyolet yöntemi ile ölçülmüştür[20]. Kuyucuklarda kalan biyofilm %1'lik krsital violet ile 5 dk. boyanmıştır. 2 kez çeşme suyuyla yıkanıp fazla olan kristal violet ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son olarak 70:30 ethanol:aseton karışımı plakalara eklenip 30 dk. beklenmiştir. Spektrofotometrede OD_{570} nm'de absorbans değerleri alınarak biyofilm kalınlığı hesaplanmıştır.

Bdellovibrio bacteriovorus Hücre Öztünün Membran Kirlenmesini Giderme Etkisinin Ölü Uçlu Reaktör Sistemi Kullanılarak İncelenmesi

Bdellovibrio bacteriovorus hücre özütünün membrane yüzeyinde oluşan biyofilmi giderme etkisi Ölü Uçlu Basınçlı Reaktör Sistemi ve mikro filtrasyon polietersülfon (PES) (gözenek büyüklüğü 0.05 mm) kullanılarak ölçülmüştür. Evsel arıtım tesisinden alınan ikincil atıksu laboratuvara getirilerek 10 L'lik havalandırmalı kesikli reaktörde sentetik atıksu (mg/L: glukoz, 650; pepton, 50; üre, 100; (NH_4) $2SO_4$, 50; KH_2PO_4, 50; K_2HPO_4, 5; $NaHCO_3$, 100; eser elementler gerekli miktarlarda eklenmiştir.) kullanılarak her gün beslenmiştir. Atık suyun askıda katı madde oranı 3.000 mg/L partikül boyutu ise 80-97 μm olarak ölçülmüştür. Besleme hacmi ve zamanı atık suyun çamur bekleme süresi (SRT) 20 gün hidrolik bekleme süresi (HRT) 48 saat olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneylerde Sterlitech Corporation Dead-End membran sistem (Model HP4750, ABD) kullanılmıştır (Şekil 1)[20]. Tam karışımlı hücrenin toplam hacmi 300 mL, kullanılabilen membran alanı ise 14.6



Şekil 1. Sterlitech Ölü Uçlu Reaktör Sisteminin şematik gösterimi.

cm^2'dir. Membran Ölü Uçlu Reaktör hücrenin taş filtresi üzerine yerleştirilmiştir. Hücreye basınç, regülatörlü hortumla bağlantı yapılarak sağlanmıştır. Atık suyu membrandan filtre etmek için kullanılan sürücü kuvvet 1.5 bar basınçtaki azot gazıdır.

Atık suyun homojenliğini Ölü Uçlu Reaktör sisteminde sağlayabilmek için hücre manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Filtrasyon süresince 500 rpm'de karıştırılmıştır. Filtrasyon sonunda süzüntü akısı aşağıda verilen denklem (2) ile hesaplanmıştır.

Denklem 2: Süzüntü akısı hesaplanması

$$J = \Delta V / A \times \Delta t$$

- dV= belirli zaman periyodunda toplanan süzüntü hacmi (L)
- Δt= zaman (sa)
- A= kullanılan membran alanı (m^2)
- J= akı ($L.m^{-2}.sa^{-1}$)

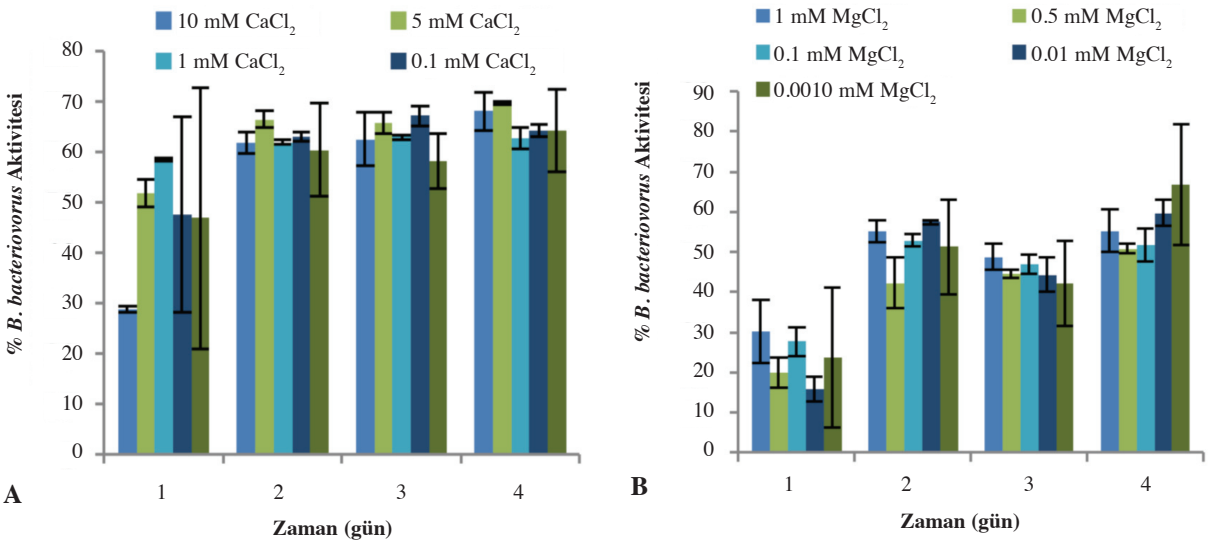
Kontrol için bir ve deney için bir olmak üzere toplam iki membran kullanılmıştır. *B. bacteriovorus* hücre özütü ile (veya kontol için tampon ile) temizleme işlemi için Ölü Uçlu Reaktör Sisteminde kullanılan membranın yüzeyinde oluşan kek tabakası sıyrılmıştır. Membran *B. bacteriovorus* hücre özütü ile oda sıcaklığında 100 rpm'de 3 saat boyunca inkübasyonda bırakılmıştır. Kontrol membranı olarak kullanılan ikinci membran ise aynı koşullarda tamponda inkubasyona bırakılmıştır. Membranlar bir sonraki filtrasyonda kullanılmışlardır.

Temizleme işlemi sonrasında membranlardan yine çamur filtrasyonu yapılıp ve yine temizleme işlemi uygulanmıştır. İlk filtrasyon temizleme işlemi öncesi yapılmıştır. İlk filtrasyon sayılmadığı taktirde temizleme ve ardından filtrasyon işlemi beş kez yinelenmiştir.

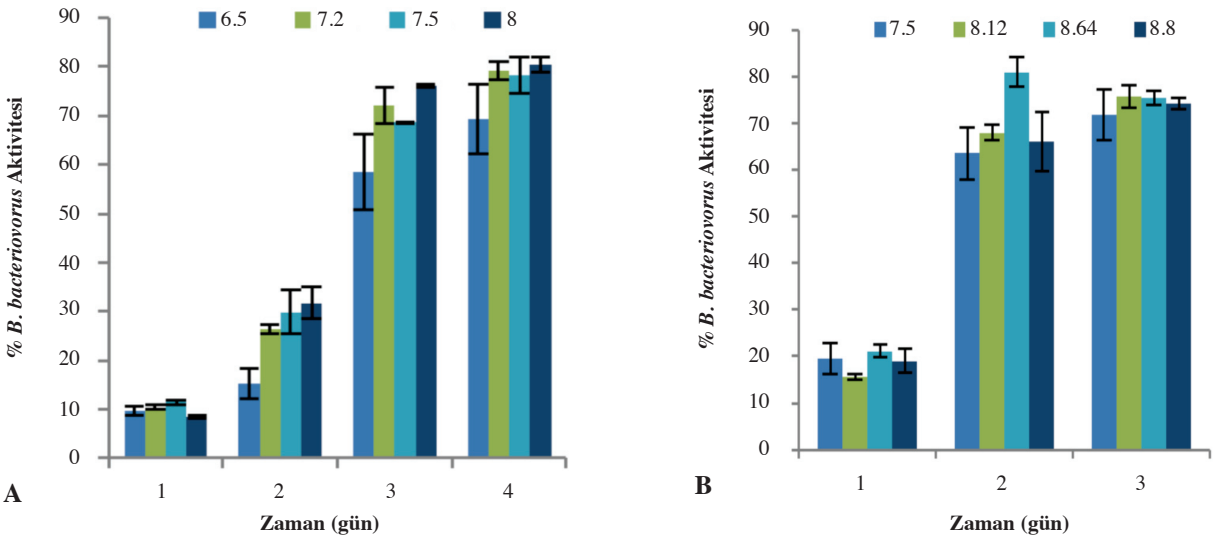
BULGULAR

Bdellovibrio bacteriovorus hücre içi litik enzimlerinin biyofilm giderimine olan etkisini incelemeden önce hücrelerinin aktivitelerini etkileyen fiziksel ve kimyasal parametreler incelenmiştir. Bu amaçla sıcaklık, pH ve mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesine olan etkilerine bakılmıştır. Farklı sıcaklıklarda (26°C, 29°C, 32°C, 35°C) üretilen *B. bacteriovorus* kültürlerinde 35°C'de 3 günlük yapılan inkübasyonda diğer sıcaklıklara kıyasla %15'lik bir artış görülmüştür ancak 35°C'de av olarak kullanılan *E. coli* hücrelerinin kendi kendine parçalanma oranı daha yüksek olduğu için deneylere 29°C'de devam edilmiştir.

Mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisini görmek amacıyla $CaCl_2$ (10 mM, 5 mM, 1 mM, 0.1 mM) ve $MgCl_2$ (1 mM, 5 mM, 0.1 mM, 0.01 mM, 0.001 mM) mineralleri belirtildiği şekilde eklenmiştir. $CaCl_2$ ve $MgCl_2$'nin HM tamponunda kullanılan konsantrasyonları sırasıyla 1 mM ve 0.1 mM'dır. Her iki mineralin test edilen konsantrasyonların aktiviteye çarpıcı bir etkisi olmamasına karşın, 5 mM $CaCl_2$'nin yüksek aktivite için optimum olduğu söylenebilir. $MgCl_2$'nin ise inkübasyonun ilk iki gününde yüksek konsantrasyonlarının daha etkili olduğu 4 günlük inkübasyonda ise 0.001 mM $MgCl_2$'nin daha verimli aktivite sağladığı belirlenmiştir (Şekil 2).



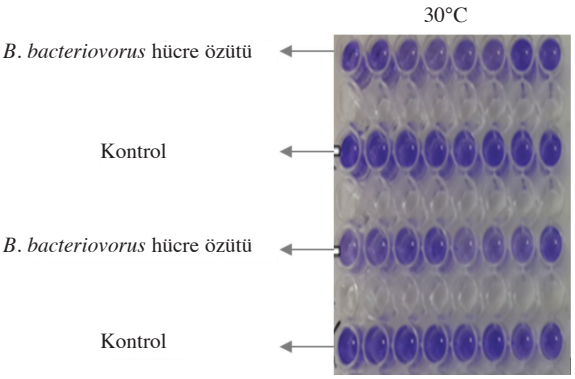
Şekil 2. HM tamponunda farklı $CaCl_2$ ve $MgCl_2$'nin konsantrasyonlarının *Bdellovibrio bacteriovorus* aktivitesine etkisi.
A) $MgCl_2$ (0,1 mM) $CaCl_2$'nin farklı konsantrasyonları.
B) $CaCl_2$ (1 mM) $MgCl_2$ farklı konsantrasyonları.



Şekil 3. pH'ın *Bdellovibrio bacteriovorus*'un aktivitesine etkisi (A) 6.5-8 pH aralığı; (B) 7.5-8.8 pH aralığı.

pH 6.5-8.8 arasında farklı pH'lara sahip kültürlerde *B. bacteriovorus*'un pH 8-8.6 arasındaki değerlerde daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3). Enzimlerin aktivitelerini etkileyen en önemli parametreler ortam pH'sı ve sıcaklıktır. Mezofilik bakteriler 30-37°C de yüksek aktivite göstermektedirler. Enzimlerin yüksek aktivite gösterdiği dolayısıyla bakterilerin de optimum üreme gösterdiği pH değeri ise genellikle nötr pH değeri olan 7 civarıdır. Ancak *B. bacteriovorus*'un pH 8 civarında daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

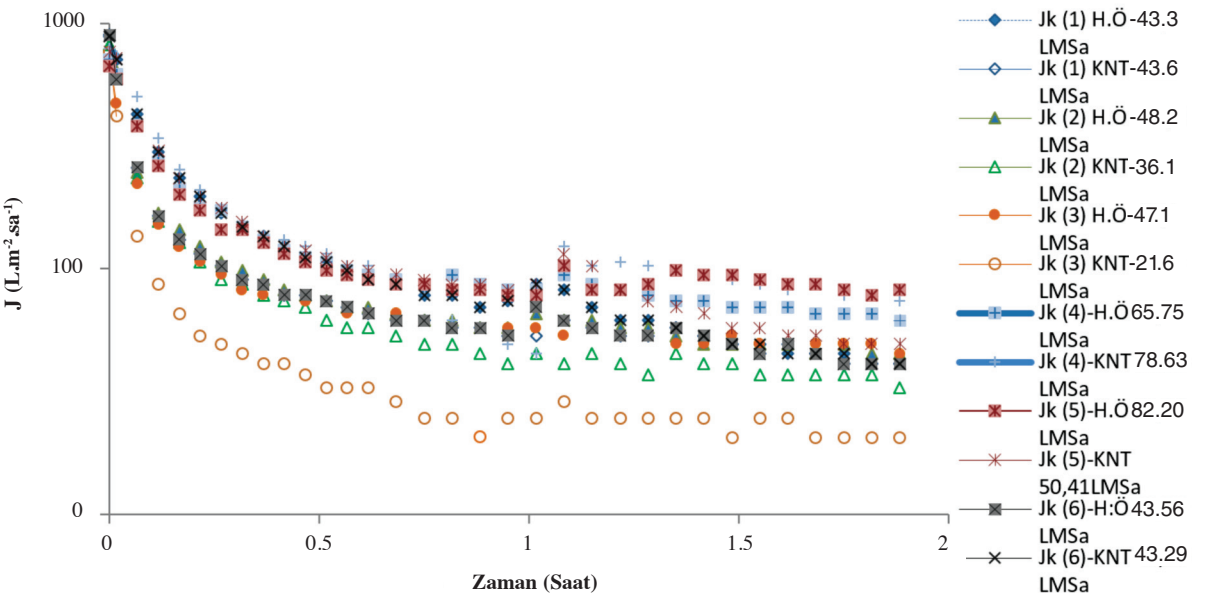
Tablo 1 ve Şekil 4'te *B. bacteriovorus* hücre özütünün 96 kuyucuklu plakalarda aktif çamur biyofilminin oluşumunu inhibe etme etkisi gösterilmiştir. Şekilde *B. bacteriovorus* eklenen kuyucuklarda aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm miktarının hücre özütü eklenmeyen kontrol kuyucuklarına kıyasla daha düşük



Şekil 4. ***Bdellovibrio bacteriovorus*** **hücre özütünün atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.**

olduğu görülmektedir. *B. bacteriovorus* hücre özütü litik enzimler de dâhil olmak üzere farklı proteinler içermektedir. Bu enzim ve proteinlerin hücrelerin plakanın duvarlarına tutunmasına engel olarak veya hücreleri parçalayarak biyofilm oluşumunu engelliyor olabileceği düşünülmektedir.

Şekil 5'te MP005 membranı ile yapılan filtrasyonlara ait akı değerleri görülmektedir. İlk akı değerleri (J1) membran hücre özütü ile yıkanmadan önceki akı değeridir. *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yıkanan membranın kararlı akı değerlerinin ortalaması (Jk2-Jk6 ortalaması) 57.4 $L.m^{-2}.sa^{-1}$ iken, kontrol membranlarının bu beş filtrasyona ait kararlı akı ortalaması 46 $L.m^{-2}.sa^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. *B. bacteriovorus* hücre özütünde bulunan enzimlerin membran yüzeyindeki biyofilm tabakayı zayıflatarak membranın gözeneklerinin daha geç tıkanmasına yardımcı olduğu dolayısıyla membranın kullanım ömrünü uzattığı sonucuna varılmıştır. Ancak membranlardan daha fazla sayıda atık su filtrasyonu yapıldığında membran yüzeyi geri dönüşümsüz olarak kirlenecektir. Bu durumda *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yıkama işlemi yetersiz kalacağından membranın zaman zaman geri yıkama veya kimyasal işlemlerle temizlenmesi gerekmektedir.



Şekil 5. ***Bdellovibrio bacteriovorus*** **hücre özütünün membran filtrasyonuna etkisi.**
(HÖ: Hücre özütü ile temizlenen membran, KNT: Kontrol membran, Jk: Kararlı akı değerleri)

Tablo 1. ***Bdellovibrio bacteriovorus*** **hücre özütünün atık su bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.**

	Biyofilm miktarı (OD_{570}) 30°C	Biyofilm miktarı (OD_{570}) 37°C	İnhibisyon etkisi (%) 30°C	İnhibisyon etkisi (%) 37°C
Atıksu + *Bdellovibrio bacteriovorus* hücre özütü	0.894±0.13	0.853±0.120	39.34	32.36
Atıksu + Tampon (Kontrol)	1.474±0.065	1.261±0.078		

TARTIŞMA

Çeşitli yüzeylerde bakterilerin oluşturduğu biyofilm çoğu zaman sorunlara neden olmakta ve giderimi için maliyeti yüksek prosesler gerekebilmektedir. Biyofilmin oluşmaması veya giderimi için fiziksel veya kimyasal çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler rutin olarak kullanılmasına rağmen, biyolojik çözümler hâlen gelişme aşamasında sayılabilir. Bakteriyel biyofilm tabakanın temizlenmesinde Qurum sensing mekanizmasının engellenmesi, çeşitli litik enzimlerin kullanımı yoğunlukla çalışılan konular arasındadır.

Bu çalışmada, Gram negatif bakterileri besin olarak kullanan avcı bir bakteri türü olan *B. bacteriovorus* hücre özütünün atıksu bakterilerinin biyofilm oluşumunu engelleme etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu hücre özütünün membran yüzeyinde oluşan biyofilm tabakayı temizleme etkisi incelenmiştir. Avcı bir bakteri türü olan *B. bacteriovorus* Gram negatif bakteriler ile beslenerek yaşamını sürdürür. Bakteriyel populasyonu dengede tuttuğundan çevre açısından önemli bir bakteridir. *B. bacteriovorus*'un parçalama aktivtesinin patojenik Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur[6]. Bu çalışma kapsamında ilk önce *B. bacteriovorus*'un çoğalması için gerekli optimum koşullar araştırılmıştır. *B. bacteriovorus* üretimi için kullanılan besiyerleri genellikle Nunez et al.[17] 2003 yılında yapmış olduğu çalışmada belirlendiği şekilde uygulanmaktadır. Bu çalışmada, sıcaklık, pH, mineral konsantrasyonu etkisi test edilmiş ve 35°C'nin, 8-8.5 arası pH değerinin aktivite için daha uygun olduğu görülmüştür.

Doksan altı kuyucuklu plakalarda *B. bacteriovorus* hücre özütü atıksu bakteri kültürüne karıştırıldığında biyofilm oluşumunu %39 oranında engellediği belirlenmiştir. *B. bacteriovorus*'un dişlerde periodontitis hastalığına neden olan *A. actinomycetemcomitans*'ı parçaladığı ve oluşturduğu biyofilm tabakayı bozduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir[9]. *Alcaligenes, Campylobacter, Erwinia, Escherichia, Helicobacter, Pseudomonas, Legionella, Shigella* türleri ve *H. pylori* bakterisinin *Bdellovibrio* tarafından parçalandığı 2010 yılında Markelova[10] tarafından gösterilmiştir. Bu konuda birçok çalışması bulunan Markelova bu bakterinin biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyeli üzerinde durmuştur.

MBR sistemleri bakteri floklarını ve askıda kalan maddeleri fiziksel olarak tümüyle tutuğundan konvansiyonel arıtıma göre daha avantajlıdır. Ancak, MBR kirlenmesi (membrane fouling) bu sistemin ticarileşmesini zorlaştırmaktadır. Kirlenmiş membanların temizlenmesi veya değiştirilmesi işletim maliyetini yükselten bir faktördür. Kullanılan geleneksel temizleme metodları (örneğin, yüzeyin modifikasyonu, işletim parametrelerinin kontrolü, düzenli fiziksel ve kimyasal yıkama gibi) fiziko-kimyasal prensiplere dayalıdır ve enerji isteyen işlemlerdir.

Literatür araştırıldığında membran yüzeyinde tıkanmalara neden olan biyofilmi *B. bacteriovorus* ile giderilebilme potansiyeli ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. *B. bacteriovorus* hücre kültürünün aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı temizleme etkisi olduğu daha önceki çalışmamızda gösterilmiştir[22]. Bu çalışmada ise hücreler toplanmış ve biyofilm giderimi amacıyla hücre özütü kullanılmıştır. *B. bacteriovorus*'un av hücreleri parçalamak için birçok aktif litik enzime sahiptir[11,12]. 2013 yılında Kim et al.[23] *B. bacteriovorus*'un *E. coli* hücrelerinin membran yüzeyinde oluşturduğu kirlenmeyi temizlediğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında atık su arıtımı sırasında MP005 membran yüzeyinde oluşan biyofilm tabaka *B. bacteriovorus* hücre özütü kullanılarak temizlenmiş ve akıda kontrole kıyasla %24.8

oranında iyileşme görülmüştür. *B. bacteriovorus* çok çeşitli konakçı profiline sahip virutik özellik gösteren bir bakteridir. Bu özelliği nedeniyle çeşitli alanlarda patojen gideriminde veya istenmeyen biyofilm tabakanın gideriminde kullanımına ilişkin araştırmalar devam etmektedir. Yapılan araştırmalardan alınan pozitif sonuçlar bu avcı bakterinin etkisi her geçen gün azalan antibiyotiklerin yerine kullanılabilecek doğal bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Teşekkür

112Y156 no'lu proje ile bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Allison DG. The biofilm matrix. Biofouling. 2003;19(2):139-50. https://doi.org/10.1080/0892701031000072190
2. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? J Hosp Infect. 2006;64(4):313-25. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028
3. Altun UH, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Derg. 2008;39:82-8.
4. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. J Wound Care. 2008;17(11):502-8. https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.11.31479
5. Xiong Y, Liu Y. Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;86(3):825-37. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2463-0
6. Dashiff A, Junka RA, Libera M, Kadouri DE. Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Appl Microbiol. 2011;110(2):431-44. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04900.x
7. Varon M, Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol. 1968;95(3):744-53.
8. Stolp H. The bdellovibrios: bacterial parasites of bacteria. Annu Rev Phytopathol. 1973;11:53-76. https://doi.org/10.1146/annurev.py.11.090173.000413
9. Van Essche M, Quirynen M, Sliepen I, Van Eldere J, Teughels W. *Bdellovibrio bacteriovorus* attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Dent Res. 2009;88(2):182-6. https://doi.org/10.1177/0022034508329693
10. Markelova NY. Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol. Int J Hyg Environ Health. .2010;213(6):428-31. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.08.004
11. Rittenberg SC, Hespell R. Energy efficiency of intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol. 1975;121(3):1158-65.
12. Ruby EG. The genus *Bdellovibrio*. In: Balows A, Starr MP, Stolp H, Truper HG, Schlegel HG, Eds, The Prokaryotes. 2nd Ed. Springer: 1992. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_25
13. Tudor JJ, McCann MP, Acrich I. A new model for the penetration of prey cells by bdellovibrios. J Bacteriol. 1990;172(5):2421-6. https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2421-2426.1990
14. Pritchard M, Langley D, Rittenberg S. Effects of methotrexate on intraperiplasmic and axenic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol. 1975;121(3): 1131-6.
15. Rittenberg SC, Langley D. Utilization of nucleoside monophosphates per Se for intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol. 1975;121(3): 1137-44.
16. Saier M Jr. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaning evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. Microbiol Rev. 1994;58(1):71-93.
17. Nú-ez ME, Martin MO, Duong LK, Ly E, Spain EM. Investigations into the life cycle of the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J at an interface by atomic force microscopy. Biophys J. 2003;84(5): 3379-88. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70061-7
18. Burnham JC, Hashimoto T, Conti S. Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram-negative bacterial hosts. J Bacteriol. 1968;96(4):1366-81.
19. Burnham JC, Stetak T, Locher G. Extracellular lysis of the bluegreen alga *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Phycol. 1976;12(3):306-13 https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1976.tb02849.x
20. Kadouri D, O'Toole GA. Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus*. Appl Environ Microbiol. 2005;71(7):4044-51. https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4044-4051.2005
21. Von Stein RS, Barber LE, Hassan MH. Biosynthesis of oxygen-detoxifying enzymes in *Bdellovibrio*. J Bacteriol. 1982;152(2):792-6.
22. Özkan M, Yılmaz H, Akay Çelik M, et al. Application of *Bdellovibrio bacteriovorus* for reducing fouling of membranes used for wastewater treatment. T J Biochem. 2018; (Baskıda).
23. Kim EH, Dwidar M, Mitchell RJ, Kwon YN. Assessing the effects of bacterial predation on membrane biofouling. Water Res. 2013;47(16):6024-32. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.023

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):38-44
doi:10.5222/TMCD.2018.038

Araştırma

Albicans-Dışı Candida Türlerinin Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazole İn Vitro Duyarlılığının Referans Sıvı Mikrodilüsyon Yöntem ile Araştırılması: Yeni Türe Özgü Klinik Direnç Sınır Değerleri ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin Uygulanması

Gülşen HAZIROLAN
Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

ÖZ

Amaç: *Hastanemizde en sık izole edilen albicans-dışı Candida türlerinin flukonazol, itrakonazol ve vorikonazole in vitro antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmaya, Ocak 2013-Haziran 2016 döneminde Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatarak tedavi gören hastaların klinik örneklerinden izole edilen albicans-dışı Candida izolatları dâhil edilmiştir. İzolatlar, konvansiyonel yöntemler ve MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. İzolatların in vitro antifungal duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M27-A3) referans sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemi ile belirlenmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, yeni türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve epidemiyolojik eşik değerleri ile yorumlanmıştır.*

Bulgular: *İzolatların tür dağılımı; Candida glabrata (n=37), Candida parapsilosis (n=24), Candida krusei (n=24), Candida tropicalis (n=14), Candida lusitaniae (n=13), Candida kefyr (n=10), Candida guilliermondii (n=2) ve Candida dubliniensis (n=2) şeklindedir. Flukonazol için iki C. glabrata izolatı dirençli, bir C. parapsilosis izolatı doza bağlı duyarlı, itrakonazol için bir C. parapsilosis ve bir C. tropicalis izolatı vahşi olmayan tip, vorikonazol için ise bir C. krusei ve iki C. parapsilosis izolatı orta duyarlı ve iki C. glabrata, beş C. kefyr ve üç C. lusitaniae izolatı vahşi olmayan tip olarak değerlendirilmiştir.*

Sonuç: *Çalışmamızda, in vitro antifungal duyarlılık profilleri test edilen 126 albicans-dışı Candida izolatında triazol direnci iki izolatta saptanmıştır ve 12 izolat triazollere vahşi olmayan tip olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatlarda triazollere çapraz direnç tespit edilmemiştir. Elde edilen bu veriler, tedaviyi doğru yönlendirmek amacıyla albicans-dışı Candida izolatları için her merkezde antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gerekliliğini vurgulamaktadır.*

Anahtar kelimeler: *Albicans-dışı Candida, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, antifungal duyarlılık profili*

ABSTRACT

Investigation of In Vitro Susceptibility of Non-albicans Candida Species Isolated from Clinical Specimens to Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole by Reference Broth Microdilution Method: Application of New Species-Specific Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values

Objective: *The aim of this study was to determine in vitro antifungal susceptibility profiles of the most frequently isolated non-albicans Candida species to fluconazole, itraconazole and voriconazole in our hospital.*

Material and Methods: *Non-albicans Candida species isolated from the clinical specimens of patients who were hospitalized in Ankara Training and Research Hospital between January 2013 and June 2016 were included in the study. Isolates were identified by conventional methods and MALDI-TOF MS. In vitro antifungal susceptibilities of isolates were determined by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M27-A3) reference broth microdilution method (BMD). Minimal inhibitor concentration values were evaluated with new species- specific clinical breakpoints and epidemiological cut-off values.*

Results: *The species distribution of the isolates were as follows; C. glabrata (n=37), C. parapsilosis (n=24), C. krusei (n=24), C. tropicalis (n=14), C. lusitaniae (n=13), C. kefyr (n= 10), C. guilliermondii (n=2) and C. dubliniensis (n=2). It was determined that two of C. glabrata isolates were resistant to fluconazole and one C. parapsilosis isolate was dose dependent susceptible to fluconazole, one C. parapsilosis and one C. tropicalis isolates were non-wild type to itraconazole, one C. krusei and two C. parapsilosis isolates were voriconazole intermediate, and two C. glabrata, five C. kefyr and three C. lusitaniae isolates were non-wild type to voriconazole.*

Conclusion: *In our study, 126 non- albicans Candida isolates were tested for in vitro antifungal susceptibility profiles, two isolates were detected as resistant to triazole and 12 isolates were evaluated as non-wild type to triazoles. No cross- resistance was observed for tiazoles in these isolates. These data emphasize the necessity of performing antifungal susceptibility tests for non-albicans Candida isolates at each center in order to direct the treatment properly.*

Keywords: *Non-albicans Candida, fluconazole, itraconazole, voriconazole, antifungal susceptibility profile*

Alındığı tarih: 21.07.2017
Kabul tarihi: 05.09.2017
Yazışma adresi: Gülşen Hazırolan, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
e-posta: drgulsencetin@yahoo.com

GİRİŞ

Son yıllarda fungal enfeksiyonlarının görülme sıklığı ciddi olarak artmıştır[1]. Hem mukokütanöz hem de yaygın enfeksiyonlarda *Candida albicans* en sık görülen tür olmasına rağmen, *albicans*-dışı *Candida* türlerinin de sıklığı giderek artmaktadır[2]. Ağır immünsupresyon, prematürite, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve ampirik antifungal ilaç kullanımı gibi birçok faktörün *albicans*-dışı *Candida* türlerinin sıklığındaki artış ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir[2,3]. *Albicans*-dışı *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların klinik bulguları genellikle birbirlerinden ayırt edilememektedir, ancak bazı *albicans*-dışı *Candida* türleri yaygın olarak kullanılan antifungal ilaçlara doğal olarak dirençlidir veya direnç kazanabilmektedir[4]. Bu nedenle klinik örneklerden *albicans*-dışı *Candida* türleri cins ve tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmalı ve antifungal duyarlılık testi uygulanarak in vitro duyarlılık profili belirlenerek antifungal tedaviye yön verilebilmelidir.

Candida türlerinin in vitro antifungal duyarlılıkların tespitinde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından maya için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi (CLSI, M27-A3) kullanılmaktadır[5]. CLSI, 2012'de yeni bir klavuz yayınlayarak, *Candida* türleri için triazol ve ekinokandin direnç sınır değerlerini revize etmiş ve türe özgü klinik direnç sınır değerlerinin kullanılmasını önermiştir[6]. *Candida* türleri için, türe özgü klinik direnç sınır değerleri bulunmayan antifungallerde ise epidemiyolojik eşik değerlerinin (EED) kullanılması önerilmektedir[6-8].

Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türlerinin flukonazol itrakonazol ve vorikonazol gibi sık kullanılan antifungal ajanlara in vitro duyarlılıklarının, referans sıvı mikrodilüsyon yöntem ile, CLSI tarafından önerilen yeni türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve EDD uygulanarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2013-Haziran 2016 tarihlerinde döneminde Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerden izole edilen (44 idrar, 36 kan, 18 balgam/BAL/DTA, 18 vajinal akıntı, 5 püy, 4 nefrostomi, 1 BOS) 126 *albicans*-dışı *Candida* kökeni dâhil edilmiştir. İzolatlar, germ tüp oluşturma özelliği, koloni morfolojisi, mısır unu-Tween-80 besiyerindeki mikroskobik görünümleri ve matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS, Bruker, Almanya) ile tanımlanmıştır.

Antifungal Duyarlılık Testleri: İzolatların flukonazol, itrakonazol ve vorikonazole in vitro antifungal duyarlılıkları CLSI tarafından önerilen M27-A3 mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır[5]. Bu amaçla, besiyeri olarak l-glutaminli, sodyum bikarbonatsız morfolinopropansulfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış RPMI-1640 besiyeri (pH:7.0) kullanılmıştır. Flukonazol (Pfizer, ABD) için 0.125-64 µg/ml; itrakonazol (Merck, ABD) için 0.015-8 µg/ml, vorikonazol (Pfizer, ABD) için de 0.015-8 µg/ml konsantrasyon arasında değişen çift kat seri sulandırımları ile 96 çukurlu U tabanlı mikroplaklar hazırlanmıştır. Kalite kontrolde *Candida krusei* ATCC 6258 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 suşları kullanılmıştır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Mikroplaklar 37°C'de 24 saatlik inkubasyon süreleri sonunda, çıplak gözle değerlendirilerek minumun inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Antifungal içermeyen kontrol kuyucuğundaki üremeye kıyasla üremenin %50 azalma gösterdiği kuyucuktaki en düşük antifungal konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Antifungal duyarlılık kategorileri, CLSI tarafından revize edilen yeni türe özgü klinik direnç sınır değerlerine göre saptanmıştır[6]. Klinik direnç sınır önerisi olmayan *albicans*-dışı *Candida* türleri ve antifungaller için ise Pfaller ve Diekema'nın[7] belirttiği EED kullanılmıştır. *Albicans*-dışı *Candida* türlerinde flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için klinik direnç sınır değerleri ve EED Tablo 1'de sergilenmiştir[6,7].

BULGULAR

İzolatlar konvansiyonel yöntemler ve MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. En sık izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türü *Candida glabrata* (n=37) olarak saptanmış, bunu *C. parapsilosis* (n=24), *C. krusei* (n=24), *Candida tropicalis* (n=14), *Candida lusitaniae* (n=13), *Candida kefyr* (n=10), *Candida guilliermondii* (n=2) ve *Candida dubliniensis* (n=2) izlemiştir. Tablo 2'de *albicans*-dışı *Candida* izolatlarının CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için, yeni CLSI türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve EED'ne göre 24 saate elde edilen MİK aralığı, $MİK_{90}$, $MİK_{50}$ değerleri özetlenmiştir. $MİK_{90}$ değeri dokuzdan daha az sayıda olan *albicans*-dışı *Candida* izolatlarında belirlenememiştir. *Albicans*-dışı *Candida* türlerinde flukonazol $MİK_{90}$ değerleri, itrakonazol ve vorikonazolden daha yüksek bulunmuştur. *C. glabrata*'da flukonazol $MİK_{90}$ değerleri, test edilen diğer *albicans*-dışı *Candida* türlerine göre daha yüksek saptanmıştır.

Tablo 1. *Albicans*-dışı *Candida* türlerinde flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için epidemiyolojik eşik değerleri ve klinik direnç sınır değerleri[6,7].

		Epidemiyolojik eşik değerleri (μg/ml)		Klinik direnç sınır değerleri (μg/ml)			
***Candida* türü**	**Antifungal ajan**	**Vahşi tip**	**Vahşi olmayan tip**	**Duyarlı**	**Doza bağlı duyarlı**	**Orta duyarlı**	**Dirençli**
					<32		**>64**
Candida glabrata	Flukonazol	<32	>32				
	İtrakonazol	<2	>2				
	Vorikonazol	<0.5	>0.5				
Candida krusei	Flukonazol	<64	>64				
	İtrakonazol	<1	>1				
	Vorikonazol	<0.5	>0.5	<0.5		1	>2
Candida parapsilosis	Flukonazol	<2	>2	<2	4		>8
	İtrakonazol	<0.5	>0.5				
	Vorikonazol	<0.12	>0.12	<0.12		0.25-0.5	>1
Candida tropicalis	Flukonazol	<2	>2	<2	4		>8
	İtrakonazol	<0.5	>0.5				
	Vorikonazol	<0.06	>0.06	<0.12		0.25-0.5	>1
Candida lusitaniae	Flukonazol	<2	>0.5				
	İtrakonazol	<0.5	>0.5				
	Vorikonazol	<0.03	>0.03				
Candida kefyr	Flukonazol	<1	>1				
	İtrakonazol	-	-				
	Vorikonazol	<0.015	>0.015				
Candida dubliniensis	Flukonazol	<0.5	>0.5				
	İtrakonazol	<0.25	>0.25				
	Vorikonazol	<0.03	>0.03				
Candida guilliermondii	Flukonazol	<8	>8				
	İtrakonazol	<1	>1				
	Vorikonazol	<0.25	>0.25				

Tablo 2. Flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için elde edilen MİK değerleri (24 saat).

		Flukonazol			İtrakonazol			Vorikonazol		
Candida türü	n	MİK aralığı	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	MİK aralığı	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	MİK aralığı	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$
Candida glabrata	37	0.125-64	4	16	<0.015-1	0.25	1	<0.015-1	0.06	0.25
Candida krusei	24				0.03-1	0.25	1	0.03-1	0.03	0.125
Candida parapsilosis	24	0.125-4	0.5	1	<0.015-1	0.125	0.5	<0.015-0.5	0.015	0.25
Candida tropicalis	14	0.125-2	0.12	2	<0.015-1	0.25	0.5	<0.015-0.25	0.015	0.125
Candida lusitaniae	13	0.125-2	0.125	0.5	<0.015-2	0.03	0.125	<0.015-0.5	0.03	0.25
Candida kefyr	10	0.25-0.5	0.25	0.5	<0.015-1	0.125	0.5	<0.015-0.5	0.125	0.125
Candida dubliniensis	2	0.015-0.125			0.125-0.25			0.25-0.25		
Candida guilliermondii	2	1-2			0.03-0.125			<0.015-0.015		

Tablo 3. Flukonazol, itrakonazol ve vorikonazole dirençli veya vahşi olmayan duyarlılık profilinde saptanan izolatlar.

Dirençli veya vahşi olmayan profil	İzolat sayısı (n, %)
***Candida glabrata* (n=37)**	
Flukonazol	2 (%5.4)
Vorikonazol	2 (%5.4)
***Candida parapsilosis* (n=24)**	
İtrakonazol	1 (%4.1)
***Candida tropicalis* (n=14)**	
İtrakonazol	1 (%7.1)
***Candida lusitaniae* (n=13)**	
Vorikonazol	3 (%23)
***Candida kefyr* (n=10)**	
Vorikonazol	5 (%50)

Mikrodilüsyon ile elde edilen MİK değerlerine göre, flukonazole iki (%5.4) *C. glabrata* izolatı dirençli, bir (%4.1) *C. parapsilosis* izolatı doza bağlı duyarlı, itrakonazole bir (%4.1) *C. parapsilosis* ve bir (%7.1) *C. tropicalis* izolatı vahşi olmayan tip (MİK>EDD), vorikonazole ise bir (%4.1) *C. krusei* ve iki (%8.3) *C. parapsilosis* izolatı orta duyarlı ve iki (%5.4) *C. glabrata*, beş (%50) *C. kefyr* ve üç (%23) *C. lusitaniae* izolatı vahşi olmayan tip (MİK>EDD) olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3).

TARTIŞMA

Son yıllarda fungal enfeksiyonların insidansı, tıbbi teknolojideki ilerlemelere bağlı olarak ciddi hastalığı bulunan hastaların sağ kalımının uzamasıyla artmıştır[9]. Fungal enfeksiyonlar yüksek mortalite oranları ile seyreder ve sağlık sistemlerine ciddi maliyet getirirler[10]. Fungal enfeksiyon etkenin doğru olarak tanımlanması ve in vitro antifungal duyarlılık profilinin belirlenmesi hastanın tedavisine önemli katkılar sağlamaktadır. Fungal enfeksiyonların etyolojisinde *C. albicans* ilk sırayı almakla birlikte, son yıllarda *albicans*-dışı *Candida* türleri ile gelişen enfeksiyon sayısında artış söz konusudur[11]. *Albicans*-dışı *Candida* türlerinin kendi içinde sıralaması, fungal enfeksiyonun bölgesine, gözlendiği merkeze ve coğrafyaya göre değişmektedir[11,12]. Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da kandidemi olgularında en sık izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türü *C. glabrata* olarak bildirilmiştir[11]. Güney Amerika ve bazı Avrupa ülkelerinde ise kandidemi olgularında en sık izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türü *C. parapsilosis* olarak saptanmıştır[13,14]. Ülkemizde ise farklı merkezlerde kandidemi olgularında ve diğer olgularda, en sık izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türleri, *C. glabrata, C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* arasında değişmektedir[15-18]. Çalışmamızda ise klinik örneklerden en sık izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türü *C. glabrata* olduğu saptanmıştır.

Albicans-dışı *Candida* türlerinde antifungal tedaviye dirençli kökenlerin ortaya çıkması in vitro antifungal duyarlılık testlerinin önemini bir kez daha vurgulamıştır[19-21]. Ayrıca *Albicans*-dışı *Candida* türlerinin in vitro antifungal duyarlılık paternleri merkezler, bölgeler arası farklı-

lıklar da gösterebilmektedir[19]. 2012 yılında CLSI en sık karşılaşılan *albicans*-dışı *Candida* türlerinde (*C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis* ve *C. krusei*) flukonazol, vorikonazol ve ekinokandinler için, yeni klinik direnç sınır değerlerini, MİK dağılımına, farmokinetik, farmadinamik, EED ve MİK değerlerine dayalı olarak elde edilen klinik sonuçlara göre belirlemiştir[6]. Ancak yeni belirlenen klinik direnç sınır değerleri, önceki klinik direnç sınır değerlerine göre daha düşüktür ve bu da önceki klinik direnç sınır değerlerine göre duyarlı olan izolatların dirençli veya doza bağlı duyarlı veya orta duyarlı olarak saptanmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda flukonazole iki (%5.4) *C. glabrata* izolatı dirençli, bir (%4.1) *C. parapsilosis* izolatı doza bağlı duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, eski klinik direnç sınır değerlerini kullanarak, Gürcüoğlu ve ark.[18] kandidemi olgularından izole edilen 26 *C. glabrata* izolatının birinde (%3.8) ve 193 *C. parapsilosis* izolatının birinde (%0.5) flukonazol direnci saptamışlardır. Çekin ve ark.[16] çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. glabrata* izolatlarının ikisini flukonazole dirençli (%9.1), *C. parapsilosis* izolatlarının ise birini (%3.6) dirençli, birini de (%3.5) doza bağlı duyarlı olarak bildirmişlerdir. Karabıçak ve ark.[22] ise yeni türe özgü klinik direnç sınır değerlerini kullanarak, kan kültürlerinden izole edilen edilen *C. glabrata* izolatlarının birini (%4.7) flukonazol dirençli, *C. parapsilosis* izolatlarının ise birini (%3.2) dirençli, birini de (%3.2) doza bağlı duyarlı olarak bildirmişlerdir. Yeni türe özgü klinik direnç sınır değerlerini kullanarak, Pfaller ve ark.[12] ABD'nde 33 farklı merkezden izole ettikleri 1694 *albicans*-dışı *Candida* izolatında flukonazol direncini *C. glabrata, C. parapsilosis* izolatlarında sırası ile %10, %4 olarak saptamışlardır. Castanheira ve ark.[23] ise 31 farklı ülkeden elde ettikleri 1514 *Candida* türünde flukonazol direncini *C. glabrata, C. parapsilosis* izolatlarında sırası ile %12, %2.3 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda belirlenen *C. glabrata* flukonazol direnç oranı, ülkemizden bildirilen oranlar ile uyumludur, yurt dışından bildirilen oranlardan ise daha düşüktür. Ayrıca çalışmamızda *C. glabrata*'da flukonazolün in vitro aktivitesi ($MİK_{90}$:16 μg/ml), diğer *albicans*-dışı *Candida* türlerinden daha düşük saptanmıştır. Ülkemizden ve yurt dışından bildirilen *C. parapsilosis* flukonazol direnç oranları birbirine benzer oranlardadır. Bizim bulgularımızda ise *C. parapsilosis* flukonazol direnci saptanmamıştır[12,16,18,22,23].

Albicans-dışı *Candida* türlerinin in vitro itrakonazol duyarlılık profili, yeni klinik direnç sınır değeri ile belirlenemediğinden, çalışmamızda MİK değerleri EDD göre yorumlanmıştır ve itrakonazole bir (%4.1) *C. parapsilosis* ve bir (%7.1) *C. tropicalis* izolatı vahşi olmayan tip (MİK > EDD) olarak saptanmıştır[7]. Ülkemizde, Küçükateş ve ark.[15] yeni klinik direnç sınır değerlerine göre *albicans*-dışı *Candida* türlerinde beş *C. glabrata* izolatının ikisinde ve on iki *C. tropicalis* izolatının üçünde itrakonazol direnci saptamışlardır. Gültekin ve ark.[24] ise *albicans*-dışı *Candida* türlerinde beş *C. glabrata* izolatının üçünde itrakonazol direnci belirlemişlerdir. Xiao ve ark.[19] 1072 *albicans*-dışı *Candida* türünde, EDD kullanarak, itrakonazole yalnızca *C. glabrata* (%9.2) ve *C. tropicalis* (%1.3) izolatlarında vahşi olmayan tip (MİK>EDD) tespit etmişlerdir. Pfaller ve ark.[25] ise 131 *albicans*-dışı *Candida* türünde itrakonazolün in vitro duyarlılığını değerlendirdiklerinde *C. glabrata, C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* izolatlarında sırası ile %9.4, %3.4 ve %3 üç oranında vahşi olmayan tip (MİK>EDD) saptamışlardır. Çalışmamızda da, ülkemizde ve dünyada itrakonazol direncinin sık gözlendiği *albicans*-dışı *Candida* türlerinde (*C. parapsilosis, C. tropicalis*), itrakonazole vahşi olmayan tip (MİK>EDD) belirlenmiştir.

Albicans-dışı *Candida* türlerinde, vorikonazol için yeni klinik direnç sınır değeri, yalnızca *C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis* için

belirlenmiştir[6]. Çalışmamızda, vorikonazol için vahşi olmayan tip (MİK>EDD) iki (%5.4) *C. glabrata*, beş (%50) *C. kefyr* ve üç (%23) *C. lusitaniae* izolatında belirlenmiştir. Ayrıca bir (%4.1) *C. krusei* ve iki (%8.3) *C. parapsilosis* izolatı da orta duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Pfaller ve ark.[26] SENTRY antimikrobiyal sürveyans program kapsamında 280 *albicans*-dışı *Candida* türünde *C. glabrata* izolatlarında vorikonazole vahşi olmayan tip (MİK>EDD) oranını %11, *C. parapsilosis, C. tropicalis* izolatlarında ise vorikonazole direnç oranını sırası ile %4.3, %5.9 olarak saptamışlardır. Ayrıca *C. parapsilosis* izolatlarında %1.1 oranında vorikonazole orta duyarlılık belirlenmiştir. Castanheira ve ark.[23] yine SENTRY antimikrobiyal sürveyans program kapsamında *C. parapsilosis, C. tropicalis* izolatlarında vorikonazole direnç oranını sırası ile %0.9, %12.3 olarak, *C. glabrata, C. guilliermondii* izolatlarında vorikonazole vahşi olmayan tip (MİK>EDD) oranını sırası ile %12, %12.5 olarak ve vorikonazole orta duyarlılık oranını *C. parapsilosis, C. tropicalis* izolatlarında sırası ile %0.9, %1.7 olarak bildirmişlerdir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda, *albicans*-dışı *Candida* türlerinde vorikonazol duyarlığı için farklı oranlar verilmiştir[19,23,26]. Çalışmamızda *albicans*-dışı *Candida* türleri arasında vorikonazole vahşi olmayan tip (MİK > EDD), en fazla *C. kefyr* izolatlarında saptanmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, *albicans*-dışı *Candida* türlerinde, vorikonazol için eski klinik direnç sınır değerleri kullanılmış ve vorikonazole in vitro direnç bildirilmemiştir[15-18,24]. Vorikonazol direncinin bildirilmemesinin nedeninin eski klinik direnç sınır değerlerinin kullanımı ile ilişik olabileceği düşünülmüştür. Ancak Karabıçak ve ark.[22] yeni klinik direnç sınır değerlerine göre *albicans*-dışı *Candida* türlerinde vorikonazol direnç oranlarını saptadıkları çalışmalarında vorikonazole, direnç iki (%7.6) *C. tropicalis* izolatında ve vahşi olmayan tip (MİK>EDD) beş (%23.8) *C. glabrata*, üç (%18.7) *C. lusitaniae* ve bir (%11.1) *C. kefyr* izolatında belirlemişlerdir. Çalışmamız *albicans*-dışı *Candida* türlerinde vorikonazol in vitro duyarlılık sonuçları Karabıçak ve ark.'nın[22] çalışmaları ile uyumludur.

Sonuç olarak, bu çalışma *albicans*-dışı *Candida* türlerinin in vitro triazol duyarlılığı yeni türe özgü direnç sınır değerleri ile belirlemiştir. İn vitro triazol duyarlılığı *albicans*-dışı *Candida* türleri arasında ve merkezler arasında farklılık gösterebileceği için, her merkezde antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gerekliliğini bir kez daha vurgulamıştır. İn vitro dirençli ve vahşi olmayan tip olarak saptanan izolatların klinik sonuçlarını gösterildiği in vivo çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-63. https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06
2. Snydman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial Candida infections. Chest. 2003;123(Suppl 5):S500-3. https://doi.org/10.1378/chest.123.5_suppl.500S
3. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol. 2013;62(Pt 1):10-24. https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0
4. Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, et al. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. J Med Microbiol. 1996;44(6):399-408. https://doi.org/10.1099/00222615-44-6-399
5. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3. 3rd ed. CLSI, Wayne: ABD, 2008.
6. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibilitytesting of yeasts. 4th Informational Supplement. M27-S4, CLSI, Wayne: ABD, 2012.
7. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. J Clin Microbiol. 2012;50(9):2846-56. https://doi.org/10.1128/JCM.00937-12
8. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, CLSI Subcommittee for Antifungal

Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drug Resist Updat. 2010;13(6):180-195. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.09.002

9. Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG. Invasive candidiasis in the intensive care unit. Crit Care Med. 2006;34(3):857-63. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000201897.78123.44
10. Cleveland AA, FarleyMM, Harrison LH, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. Clin Infect Dis. 2012;55(10):1352-61. https://doi.org/10.1093/cid/cis697
11. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. Front Microbiol. 2017;12:2173. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173
12. Pfaller MA, Jones RN, Castanheira M. Regional data analysis of *Candida* non-*albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006-2011. Mycoses. 2014;57(10):602-11. https://doi.org/10.1111/myc.12206
13. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(3):401-5. https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000300020
14. Gomez J, Garcia-Vazquez E, Espinosa C, et al. Nosocomial candidemia at a general hospital: the change of epidemiological and clinical characteristics. A comparative study of 2 cohorts (1993-1998 versus 2002-2005). Rev Iberoam Micol. 2009;26(3):184-8. https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.02.003
15. Küçükates E, Gültekin NN, Alisan Z, Hondur N, Özturk R. Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agents. Saudi Med J. 2016;37(7):750-7. https://doi.org/10.15537/smj.2016.7.13412
16. Çekin Y, Pekintürk N, Cekin AH. Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının tür dağılımı ve antifungal direnç oranlarının değerlendirilmesi. J Clin Anal Med. 2015;6(1):8-11.
17. Yiğit N, Aktaş E. Amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazollünün kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerine karşı antifungal aktivitesinin mikrodilüsyon ve disk diffüzyon yöntemleri ile belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2014;71(3):131-40.
18. Gürcüoğlu E, Ener B, Akalin H, et al. Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study. Epidemiol Infect. 2010;138(9):1328-35. https://doi.org/10.1017/S0950268809991531
19. Xiao M, Fan X, Chen SC, et al. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. Antimicrob Chemother. 2015;70(3):802-10. https://doi.org/10.1093/jac/dku460
20. Orasch C, Marchetti O, Garbino J, et al. *Candida* species distribution and antifungal susceptibilitytesting according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland. Clin Microbiol Infect. 2014;20(7):698-705. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12440
21. Fothergill AW, Sutton DA, McCarthy DI, Wiederhold NP. Impact of new antifungal breakpoints on antifungal resistance in *Candida* species. J Clin Microbiol. 2014;52(3):994-7. https://doi.org/10.1128/JCM.03044-13
22. Karabıçak N, Alem N. *Candida* türlerinin triazol antifungal duyarlılık profilleri: Antifungal direncin belirlenmesinde yeni CLSI türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve epidemiyolojik eşik değerlerinin uygulanması. Mikrobiyol Bul. 2016;50(1):122-32. https://doi.org/10.5578/mb.10682
23. Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY antifungal surveillance program (2013). Diagn Microbiol Infect. Dis. 2016;85(2):200-4. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.009
24. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2011;45(2):306-17.
25. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Jones RN. In vitro antifungal susceptibilities of isolates of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. from China to nine systemically active antifungal agents: data from the SENTRY Antifungal Surveillance Program, 2010 through 2012. Mycoses. 2015;58(4):209-14. https://doi.org/10.1111/myc.12299
26. Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Castanheira M. Activity of a long-acting echinocandin (cd101) and seven comparator antifungal agents tested against a global collection of contemporary invasive fungal isolates in the SENTRY 2014 Antifungal Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(3): pii:e02045-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02045-16

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):45-51
doi:10.5222/TMCD.2018.045

Araştırma

Vankomisine Dirençli Enterokok Taramasında Kültür Sonuçlarının BD GeneOhm *Van*R Test Sonuçları ile Karşılaştırılması

Reyhan YİŞ
Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir

ÖZ

Amaç: *Kültür bazlı vankomisin dirençli enterokok (VRE) identifikasyon yöntemleri genellikle 24-72 saat gerektirmektedir. VRE kolonizasyonu saptanan hastaların hızla izole edilmesi, diğer hastaların kolonize olmalarını engellemek ve olası enfeksiyonların oluşumunu önlemesi açısından değerlidir. Bu çalışmanın amacı, VRE'yi daha kısa sürede saptayan BD GeneOhm VanR testinin sonuçlarının altın standart yöntem olan VRE kültürü ile karşılaştırılmasıdır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmamızda yer alan toplam 704 perirektal sürüntü örneğinin VRE agara ekimi yapılmıştır. Eşzamanlı olarak tüm perirektal sürüntü örnekleri Real-time PCR yöntemi ile çalışılmıştır.*

Bulgular: *Değerlendirilen örneklerden 121'i (%17.2) VRE agar ile 162'si (%23.0) Real-time PCR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Yöntemlerinin her ikisi ile pozitif çıkan örnek sayısı 118'dir. Kırk dört örnek yalnızca Real-time PCR ile 3 örnek ise yalnızca kültür yöntemiyle pozitif bulunmuştur. Her iki yöntemle negatif bulunan örnek sayısı 539 (%76.6)'dur. VRE pozitif saptanan örneklerden 3 tanesi haricinde tümü, VanA fenotipi taşıyan Enterococcus faecium olarak, sözü edilen 3 örnek, hem kültür hem de Real-Time PCR yöntemi ile VanB fenotipi taşıyan Enterococcus faecalis olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre, BD GeneOhm VanR testinin VRE kültürü ile karşılaştırılarak belirlenen duyarlılık, özgüllük, pozitif (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) sırasıyla %98, %92, %73 ve %99 olarak saptanmıştır.*

Sonuç: *VRE belirlenmesi için kullanılan kültür bazlı yöntemler ve nükleik asit amplifikasyon testleri genellikle 24-72 saat gerektirmektedir. BD GeneOhm VanR testi doğrudan örnekten çalışılan basit bir yöntem olup, sonuç alma aşamasına kadar geçen toplam süre 3.5 saatten daha kısadır. Bunun yanında farklı laboratuvarlarda ve hasta popülasyonlarında yinelenebilir sonuçlar veren, yüksek PPD ve NPD olan bir testtir. VRE direnç genini de belirliyor olması da diğer bir avantajıdır.*

Anahtar kelimeler: *Vankomisine dirençli enterokok, kolonizasyon, Real-Time PCR, sürveyans*

ABSTRACT

Comparison of the Results of BD GeneOhm VanR Assay with Those of the Culture for Screening of Vancomycin-Resistant Enterococci

Objective: *Culture-based vancomycin resistant enterococci (VRE) identification methods generally require 24-72 hours. Rapid isolation of VRE colonised patients is crucial to prevent colonisation of other patients and propable infections. The aim of this study is to compare the results of BD GeneOhm VanR test which identifies VRE in a short time with the gold standard which is VRE culture.*

Material and Methods: *A total of 704 samples in the study were cultivated on VRE agar. At the same time, all perirectal swap samples were evaluated with real-time PCR.*

Results: *Among the evaluated samples, 121 (17.2%) were positive with VRE agar and 162 (23.0%) were positive with real-time PCR. The number of samples which were positive with both diagnostic methods were 118. Of the samples, 44 were found to be positive only with real-time PCR and 3 with culture methods. The number of samples negative with both methods were 539 (76.6%). All VRE positive samples except 3 were Enterococcus faecium carrying VanA phenotype, and the 3 samples mentioned were identified as E. faecalis carrying VanB phenotype with both culture and real-time PCR. According to these results; sensitivity, specificity, positive predictive (PPV) and negative predictive values (NPV) of BD GeneOhm VanR test compared to VRE culture were 98, 92, 73, and 99%, respectively.*

Conclusion: *Culture-based methods and nucleic acid amplification tests require 24-72 hours for VRE identification. BD GeneOhm VanR test is a simple diagnostic method that is directly carried out on the sample and takes less than 3.5 hours to obtain results. On the other hand, it gives repeatable results in patient samples and in different laboratories, and it has high PPV and NPV. Its other advantage is the identification of the VRE-resistance gene.*

Keywords: *Vancomycin-resistant enterococcus, colonization, Real-Time PCR, surveillance*

Alındığı tarih: 12.06.2017
Kabul tarihi: 12.09.2017
Yazışma adresi: Reyhan Yiş, Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Karabağlar / İzmir
Tel: (0232) 250 50 50 / 6133
e-posta: reyhanyis@yahoo.com

GİRİŞ

Enterokok türleri, son zamanlarda yüksek ölüm oranına sahip olan ve en sık saptanan nozokomiyal patojenlerden biri hâline gelmiştir. İnsanlarda gastrointestinal sistem flora elemanı olan enterokoklar, üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının artışına paralel bir şekilde hastane enfeksiyonu etkeni olarak sıklıkla saptanmaya başlanmıştır. Enterokoklar genellikle hastane ortamında immun sistemi zayıflamış kişilerin endojen florasından kaynaklanan bakteriyemi, endokardit, peritonit, menenjit, neonatal sepsis, üriner sistem enfeksiyonları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, intraabdominal veya pelvik enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir[1-3]. İntrensek dirençli olmaları nedeniyle, 1970'li yılların ortalarından itibaren üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımında artışa paralel olarak, enfeksiyon etkeni olarak daha sık saptanmaya başlamışlardır[4].

Enterokokların, Gram pozitif etkinliği olan birçok antimikrobiyal ajana karşı kısmi veya tam direnç gösterdiği, birçok antibiyotiğe intrensek dirençli olduğu, yeni mekanizmalarla antibiyotik direnci oluşturduğu ve bu direnci aktarabildiği de bilinmektedir[5,6]. Vankomisine dirençli enterokok enfeksiyonu ilk olarak 1988 yılında Uttley ve ark. tarafından İngiltere'den bildirilmiştir. Hemen ardından Fransa, Belçika, Almanya gibi diğer Avrupa ülkelerinden bildirilmiş, daha sonra Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde saptanmış ve çok hızlı bir yayılım göstermiştir[7-10]. Ülkemizde ilk dirençli suş Akdeniz Üniversitesi'nde izole edilmiş ve yıllar içinde bunu diğer olgular izlemiştir[11]. Nozokomiyal enfeksiyonlarda en önemli vankomisin dirençli enterokok (VRE) kaynağı hastanede yatan hastalardaki GİS kolonizasyonudur[12,13]. Hastanede yatış süresinin uzaması, antibiyotik kullanım öyküsü ve altta yatan ciddi hastalıklar kolonizasyon riskini artırmaktadır[14]. Özellikle dirençli enterokokların etken olduğu enfeksiyonlar hastane içinde hastadan hastaya kolaylıkla yayılım gösterebilmektedir[4,15].

Başarılı bir VRE kontrol programının en önemli bileşenlerinden biri gastrointestinal kolonizasyonun hızlı ve doğru belirlenmesidir. Bu nedenle, VRE taşıyan hastaların VRE rezervuarları kendi gastrointestinal sistemleri olduğu için düzenli aralıklarla perirektal sürüntü örnekleri almak, VRE belirlenmesinde altın standarttır. VRE ile kolonize hastalar genellikle asemptomatik olduğu için yüksek risk grubuna giren hastalardan alınan sürveyans kültürlerinin mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından en doğru ve en kısa zamanda sonuçlandırılması büyük önem taşımaktadır.

VRE belirlenmesi için kullanılan kültür bazlı yöntemler genellikle izolasyon, tanımlama ve duyarlılık testi için 24-72 saat gerektirmektedir[16]. Ancak, VRE kolonizasyonunu 24 saatten daha kısa sürede belirleyerek, VRE yayılmasını önleyecek olan bariyer önlemlerinin uygulanmasına olanak sağlayacak uygun bir tarama testinin kullanılması gerekmektedir. VRE belirlenmesi için çeşitli nükleik asit amplifikasyon testleri geliştirilmesine rağmen, bunlar komplike ekstraksiyon ve saptama rejimleri içerdikleri için veya kültür basamağına gereksinim duydukları için zaman kaybına neden olmaktadırlar[17-19].

BD GeneOhm *Van*R testi doğrudan perianal veya rektal sürüntü örneklerinden VRE taraması için kullanılan basit bir yöntem olup, test Cepheid SmartCycIer® üzerinde gerçekleştirilir. Ekstraksiyon aşamasından değerlendirme aşamasına kadar geçen toplam süre 3.5 saatten daha kısadır. Bu çalışmada, Gaziantep Çocuk Hastanesi'nde yoğun antibiyotik kullanımının olduğu servislerde yatan hastaların VRE taraması amacıyla alınan perirektal sürüntü örneklerinden VRE saptanması için kullanılan selektif besiyeri saptama sonuçları Real-Time PCR (BD GeneOhm *Van*R) test performansı ile karşılaştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Gaziantep Çocuk Hastanesi'nde yoğun antibiyotik kullanımının olduğu servislerde yatan toplam704 hastadan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş olan perirektal sürüntü örnekleri alınmıştır. Örneklerin gönderilen servislere göre dağılımı Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. Örneklerin gönderilen servislere göre dağılımı.

	Hasta sayısı
Çocuk Cerrahi Servisi	87
Çocuk Cerrahi Yoğun Bakım	32
Yan Dallar Servisi	49
Yan Dallar Yoğun Bakım	98
Yeni Doğan Yoğun Bakım	178
Yoğun Bakım	242
Süt Çocuğu Servisi	18
TOPLAM	704

Çalışmamızda yer alan toplam 704 perirektal sürüntü örneğinin 6 μg/ml vankomisin içeren suplementli VRE Agar Base (Oxoid) ekimi yapılmış ve 35°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrası değerlendirmeye alınmıştır. İdentifikasyonda konvansiyonel yöntemlerin yanında, API 20 Strep (BioMérieux, Fransa) bakteri identifikasyon kiti ve VITEK2 (BioMérieux, Fransa) tam otomatize identifikasyon sistemi kullanılmıştır. İzolatların vankomisin (30 μg) ve teikoplanin (30 μg) duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle CLSI kriterlerine uygun olarak araştırılmıştır. Bunun yanında, VITEK2 antibiyogram kartı AST-592 kullanılarak vankomisin ve teikoplanin duyarlılıkları belirlenmiştir.

BD GeneOhm *Van*R: Eşzamanlı olarak tüm perirektal sürüntü örnekleri BD GeneOhm *Van*R kiti (BD Diagnostics) kullanılarak Real-Time PCR cihazı SmartCycler® (Cepheid, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

İstatistiksel analiz: İstatistiksel analiz için tanımlayıcı-deskriptif istatistikyöntemi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler yüzde (%) değerlerle belirtilmiştir. BD GeneOhm *Van*R testinin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerleri (PPV ve NPV) perianal sürüntü örnekleri ile yapılan VRE kültürü ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Değerlendirilen örneklerden 121'i (%17.2) VRE Agar ile, 162'si (%23.0) Real-Time PCR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Yöntemlerin her ikisi ile pozitif çıkan örnek sayısı 118 iken, 44 örnek yalnızca Real time PCR ile, 3 örnek ise yalnızca kültür yöntemiyle pozitif bulunmuştur. Her iki yöntemle negatif bulunan örnek sayısı 539 (%76.6)'dur. Yöntemler arası toplam uyum %93 (657/704) olarak belirlenmiştir. Pozitif saptanan örneklerden 3 tanesi haricinde tümü, *Van*A fenotipi taşıyan *E. faecium* olarak saptanmış, sözü edilen 3 örnek, hem kültür hem de Real-Time PCR yöntemi ile *Van*B fenotipi taşıyan *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre, BD GeneOhm *Van*R testinin perianal sürüntü örnekleri ile yapılan VRE kültürü ile karşılaştırılarak belirlenen duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri (PPV ve NPV) sırasıyla %98, %92, %73 ve %99 olarak saptanmıştır. Çalışmadaki kültür ve Real-Time PCR sonuçları Tablo 2'de yer almaktadır.

Tablo 2. Kültür ve Real-Time PCR sonuçları.

		Kültür		
		+	-	Toplam
Real-Time PCR	+	118	44	162
	-	3	539	542
Toplam		121	583	704

TARTIŞMA

Özellikle son yıllarda hastane ortamındaki VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu, hastadan hastaya bulaş riski ve özellikle zor tedavi edilebilir

nozokomiyal enfeksiyonlar açısından önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalar arası geçişi engelleyecek olan tüm izolasyon çalışmaları laboratuvar sonuçlarına göre planlanacağı için, mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından VRE tanımlamasının doğru ve hızlı bir şekilde yapılması, vankomisin direncinin saptanması, VRE kolonizasyon ve enfeksiyonunun belirlenmesi ve yayılmasının önlenmesi için önemlidir. Daha önce aynı çocuk hastanesinde yapılan bir başka çalışmada, nokta prevalans yöntemi ile yapılan VRE taramasında 6 μg/ml vankomisin içeren VRE Agara ekilmiş perirektal sürüntü örneklerinin VITEK2 (bioMérieux, Fransa) tam otomatize sistemiyle identifikasyonu sonucunda elde edilen %14.6'lık kolonizasyon oranının sıkı temas izolasyonu, hastane personelinin eğitimi ve kısıtlı antibiyotik kullanım politikaları sonucunda %3.3'e gerilemiş olduğu bildirilmiştir[4]. Bu açıdan nozokomiyal VRE kolonizasyonunun ve enfeksiyonlarının hızlı ve doğru olarak belirlenmesi, etkenlerin doğru tanımlanması, antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması açısından önem taşımaktadır.

VRE'lerin izolasyonu için laboratuvarlar kendi koşullarına göre tarama metodları kullanmaktadırlar. Günümüzde ticari olarak mevcut olan veya in-house olarak hazırlanan sıvı veya katı birçok besiyeri kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda bu tarama metodlarının duyarlılık ve özgüllükleri birbiriyle karşılaştırılmaktadır[20]. Hazırlanan seçici besiyerlerinde düşük düzeyde glikopeptid direncinin saptanabilmesi için 6 μg/ml vankomisin konsantrasyonunun uygun olduğu belirlenmiştir[16,20-22]. Çalışmamızda da, 6 μg/ml vankomisin içeren suplementli VRE Agar kullanılmıştır. Enterokoklar, laboratuvarlarda genel amaçlı besiyerlerinde kolayca üretilseler de, özellikle VRE suşlarının, dışkı gibi normal flora üyesi olarak çok sayıda ve çeşitte bakterinin bulunduğu örneklerden izolasyonu sorun yaratabilmektedir[16,20,21]. Nükleik asit amplifikasyon teknikleri, dışkı örneklerinde VRE suşlarının saptanması için günümüzde önem kazanmış olsa da, bu teknolojiyi kullanma olanağı olmayan klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için hâlen güvenilir kültür yöntemlerine gereksinim vardır[16,20]. Ancak özellikle son yıllarda hızlı tanıda yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler, tanımlama süresini kısaltarak, önlemlerin daha erken dönemde alınmasında avantaj sağlamaktadır[23].

VRE'nin saptanması için moleküler yöntemlerle klasik yöntemleri karşılaştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Marner ve ark.[24] tarafından, perianal sürüntü örneklerinin GeneXpert *Van*A/*Van*B PCR yöntemiyle incelenmesinin hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, nozokomiyal sürveyans örneklerinin PCR ve konvansiyonel kültür sonuçları karşılaştırılmış, PCR yönteminin özgüllük, duyarlılık, PPD ve NPD sırasıyla %99.8, %95.4, %98.8 ve %99.3 olarak bulunmuştur. VRE'yi saptamak için gerekli zaman PCR ile 48 saat, konvansiyonel yöntem ile 96 saat olarak belirlenmiştir[25]. PCR'nin yoğun rutin iş yükü olan laboratuvarlarda VRE sürveyansı için kültüre bir alternatif olabileceği ve özellikle VRE prevalansının düşük olduğu hastanelerde maliyet-etkin olduğunu araştırıcılar tarafından vurgulanmıştır[25,26].

VRE taraması için hızlı moleküler tanı yöntemlerinden olan BD GeneOhm *Van*R testi (BD GeneOhm, San Diego, ABD) ABD Gıda ve İlaç Kurumu tarafından direkt perianal sürüntüden VRE taraması için kullanılabilecek in vitro test olarak onaylanmıştır. Bu hızlı moleküler yöntem, sonuçlanması günlerce sürebilecek kültür temelli yöntemlerle karşılaştırıldığında VRE taşıyıcılarının kısa sürede saptanmasına yardımcı olmakta, bu şekilde bir hastadan diğerine yayılım önlenebilmektedir.

BD GeneOhm *Van*R testi direkt olarak rektal

sürüntü ve gayta örneklerinden çalışılabilinen bir yöntemdir. Test standart VRE kültür teknikleri ile karşılaştırıldığında % 95 duyarlılık göstermektedir[27]. Üretici firmaya göre, *Van*R testinin saptama limiti hem *Van*A hem de *Van*B VRE için, yaklaşık olarak 2 CFU/reaksiyona denk gelen, reaksiyon başına 10 genom kopyadır. Bu saptama limiti testte yalancı negatifliklere yol açan faktörlerden biridir.

Werner ve ark.[28] selektif katı besiyerinde direkt kültür ile zenginleştirme sonrası PCR ve tarama örneklerinden direkt VRE tanımlanması için BD GeneOhm™ *Van*R testini karşılaştırmışlardır. Toplam 1786 örnek çalışılmış, genel duyarlılık % 93.1, özgüllük yalancı pozitif *Van*B sonuçlarına bağlı olarak %87.0 olarak saptanmıştır[28].

Usacheva ve ark.[29] çok merkezli olarak perianal ve rektal örneklerden VRE türlerinin doğrudan, hızlı belirlenmesinde BD GeneOhm *Van*R testinin performansını değerlendirmişlerdir. ABD'nin farklı üç coğrafi bölgesinden 1027 perianal ve rektal sürüntü örnekleri BD GeneOhm *Van*R testi ile çalışılmış ve sonuçlar doğrudan kültür yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Testin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri %93, %82, %54 ve %98 olarak saptanmıştır. Yazarlara göre *Van*B yalancı pozitiflikleri nedeniyle testin özgüllüğü düşük olarak bulunmuştur. Testin, *Van*A genotip baskın olan çeşitli popülasyonların VRE taranması için basit, hızlı ve kabul edilebilir bir yöntem olduğu, yalancı pozitifliklerin belirgin yüksek saptanması nedeniyle *Van*B genotip pozitif saptanan sonuçların kültür ile doğrulanması gerektiği sonucu vurgulanmıştır[29]. Çalışmamızda BD GeneOhm *Van*R yönteminin performansı selektif besiyerinin sonuçları ile karşılaştırıldığında, duyarlılık %98, özgüllük %92 olarak saptanmıştır. PPD %73 ve NPD %99 olarak bulunmuştur. Hastanemizde *Van*A fenotip baskın olduğu için VanB fenotip pozitifliklerine bağlı yalancı pozitiflik nadirdir. Bu nedenle özgüllük diğer çalışmalara göre, çalışmamızda daha yüksek olarak bulunmuştur. Kullandığımız selektif besiyeri ile BD GeneOhm *Van*R kiti kullanımı ile elde edilen sonuçlar arası toplam uyum %93 (657/704) olarak belirlenmiş ve uyumun değerlendirilmesinde Cohen kappa değeri 0.68 (iyi düzeyde uyumlu) olarak saptanmıştır.

BD GeneOhm *Van*R testinin *Van*B genotipi ile ilgili yanlış pozitiflik oranlarının yüksekliği, son zamanlarda *Clostridium* spp, *Eggerthella lenta, Streptococcus* spp ve *Ruminococcus* spp gibi nonenterokokal anaerobik mikroorganizmaların VanB genetik elemanı taşıdığının kanıtlanmış olmasıyla açıklanabilir. Yanlış pozitiflik oranlarının büyük kısmından *Van*B sorumlu olsa da, ender olarak *Van*A yanlış pozitifliklerinin cansız VRE izolatları veya *Bacillus circulans, Arcanobacterium haemolyticum, Oerskovia turbata* ve *Staphylococcus aureus* gibi kazanılmış *Van*A sekansı bulunduran bakterilerden kaynaklandığı düşünülmektedir[17,30,31].

Çalışmamızda, toplam olarak 704 izolatın 3 tanesinde (%0.43) her iki yöntem ile *Van*B genotipi taşıyan *E. fecalis* saptanmış olup, *Van*A genotipinin VRE'ler içinde baskın popülasyon olduğu söylenebilir. Ülkemizdeki durum değerlendirildiğinde çalışmalarda, *Van*A fenotip baskın olduğu görüleceği için testin ülkemizde kullanımının uygun olabileceği açıktır[4,32,33].

Sonuç olarak, BD GeneOhm *Van*R Testi farklı laboratuvarlarda ve hasta popülasyonlarında yinelenebilir sonuçlar veren, özellikle *Van*A saptanması için yüksek NPD ve PPD olan bir testtir. Bununla birlikte, *Van*B pozitif sonuç, VRE varlığını doğrulamak için kültür ile doğrulanmalıdır. Ancak hasta izolasyonu için zamanla yarışılan kolonizasyon taramalarında, kar zarar hesabı iyi yapılarak karar verilmesi gerektiği için moleküler yöntemlerle çok kısa sürede saptanan pozitifliklerin bildirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Tüm hastaneler VRE ile kolonize olan has-

taları erken dönemde saptayarak gerekli izolasyon önlemlerini almak, hastane içi yayılımı ve klinik enfeksiyonların ortaya çıkışını önlemek amacıyla uygun izolasyon ve identifikasyon yöntemini belirlemeli, gerekli durumlarda moleküler yöntemlerden yararlanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Arias AC, Murray BE. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* group, and *Leuconostoc* species, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia, ABD: Churchill Livingstone; 2010: 2643-53.
2. Başustaoğlu A. Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu, In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (ed), Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 141-58.
3. Berktaş, M, Çıkman, A, Parlak, M, et al. Kan kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnci. Sakaryamj. 2013;3(2):76-9.
4. Yiş R, Aslan S, Çıtak Ç, Değirmenci S. Gaziantep Çocuk Hastanesi'nde vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunun değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2011;45(4):646-54.
5. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections and antimicrobial resistance. Indian J Med Res. 2008;128(2):111-21.
6. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill. 2008;13(47):pii19046.
7. DeLisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. Chest. 2003;123(Suppl 5):S504- 18. https://doi.org/10.1378/chest.123.5_suppl.504S
8. Friden TR, Munsiff SS, Low DE, et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. Lancet. 1993;342(8863):76-9. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91285-T
9. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med. 1988;319(3):157-61. https://doi.org/10.1056/NEJM198807213190307
10. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988;1(8575-6):57-8.
11. Vural T, Şekercioğlu AO, Öğünç D, ve ark. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. ANKEM Derg. 1999;13(1):1-4.
12. Taşbakan MI. Vankomisine dirençli enterokok olguları. ANKEM Derg. 2010;24(Ek2):E82-4.
13. Kutlu M, Kutlu SS, Şardan YÇ, et al. Nozokomiyal vankomisin dirençli enterokok kolonizasyonunun araştırılması. Hastane Infeks Derg. 2006;10(3):173-7.
14. Bowler IC, Storr JA, Davies GJ, Crook DW. Guidelines for the management of patients colonized or infected with vancomycin-resistant enterococci. J Hosp Infect. 1998;39(1):75-7. https://doi.org/10.1016/S0195-6701(98)90247-X
15. Edmond MB, Ober JF, Wienbaum DL, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. Clin Infect Dis. 1995;20(5):1126-33. https://doi.org/10.1093/clinids/20.5.1126
16. Novicki TJ, Schapiro JM, Ulness BK, et al. Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin resistant *Enterococcus* from fecal material. J Clin Microbiol. 2004;42(4):1637-40. https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1637-1640.2004
17. Domingo MC, Huletsky A, Giroux R, et al. High prevalence of glycopeptide resistance genes vanB, vanD, and vanG not associated with enterococci in human fecal flora. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(11):4784-6. https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4784-4786.2005
18. Palladino S, Kay ID, Flexman JP, et al. Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by Real-time multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2483-6. https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2483-2486.2003
19. Paule SM, Trick WE, Tenover FC, et al. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4805-7. https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4805-4807.2003
20. Gümüş D, Şelale DS, Nakipoğlu Y, Küçüker MA. Vankomisine dirençli enterokokların izolasyonunda değişik besiyerlerinin araştırılması. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2011;41(4):162-7.
21. Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, van Laer F, Goossens H. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1436-40.
22. Brown DF, Walpole E. Evaluation of selective and enrichment media for isolation of glycopeptide resistant enterococci from faecal specimens. J Antimicrob Chemother. 2003;51(2):289-96. https://doi.org/10.1093/jac/dkg076
23. Josko D. Molecular bacteriology in the clinical laboratory. Clin Lab Sci. 2010;23(4):237-41.
24. Marner ES, Wolk DM, Carr J, et al. Diagnostic accuracy of the Cepheid GeneXpert vanA/vanB assay ver. 1.0 to detect the vanA and vanB vancomycin resistance genes in *Enterococcus* from perianal specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(4):382-9. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.11.005
25. Jayaratne P, Rutherford C. Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. J Clin Microbiol. 1999;37(6):2090-2.
26. Atalay S, Ece G, Şamlıoğlu P, et al. İzmir'de üçüncü basamak bir hastanede görülen vankomisine dirençli enterokok olgularının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2012;46(4):553-9.
27. Stamper PD, Cai M, Lema C, Eskey K, Carroll KC. Comparison of the BD GeneOhm VanR assay to culture for identification of vancomycin-resistant

enterococci in rectal and stool specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(10):3360-5. https://doi.org/10.1128/JCM.01458-07
28. Werner G, Serr A, Schütt S, et al. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(4):512-21. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.04.004
29. Usacheva EA, Ginocchio CC, Morgan M, et al. Prospective, multicenter evaluation of the BD GeneOhm VanR assay for direct, rapid detection of vancomycin-resistant *Enterococcus* species in perianal and rectal specimens. Am J Clin Pathol. 2010;134(2):219-26. https://doi.org/10.1309/AJCPR1K0QFLBJSNH
30. Mehta MS, Paule SM, Hacek DM, Thomson RB, Kaul KL, Peterson LR. Optimization of a laboratory-developed test utilizing Roche analyte-specific reagents for detection of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus,* and vancomycin-resistant *Enterococcus species*. J Clin Microbiol. 2008;46(7):2377-80. https://doi.org/10.1128/JCM.00230-08
31. Dahl KH, Sundsfjord A. Transferable VanB2 Tn5382-containing elements in fecal streptococcal strains from veal calves. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(8):2579-83. https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2579-2583.2003
32. Ergani Ozcan A, Naas T, Baysan BO, et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother. 2008;61(5):1033-9. https://doi.org/10.1093/jac/dkn066
33. Güdücüoğlu H, Aktaş E, Cömert FB, et al. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Pediatri Servisinde vankomisine dirençli enterokokların ilk izolasyonu ve çoğul klonların tespiti. Mikrobiyol Bul. 2009;43(5):535-43.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):52-59
doi:10.5222/TMCD.2018.052

Araştırma

Doğu Anadolu Bölgesinde Şarbon Etkeni ve Seroprevalansının Araştırılması

Çiğdem Eda BALKAN*, Selahattin ÇELEBİ**
**Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars*
***Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum*

ÖZ

Amaç: *Şarbon; Bacillus anthracis endosporlarının vücuda deri, solunum ya da gastrointestinal yolla girmesiyle oluşan özellikle otçul hayvanların içinde bulunduğu bir grupla yayılan, ölümcül bakteriyel bir zoonozdur. Bacillus anthracis'in temel virulans faktörlerinden biri toksinleridir. Bunlar protektif antijen (PA), ödem faktör ve letal faktördür. Protektif antijen özellikle diğer iki toksinin hücre içine girmesinden sorumludur. Biz de çalışmamızda, yöremizdeki prevalansı saptamak amacıyla bölgemiz hastanelerine başvuran kişilerden şarbon şüpheli görülen hastaların kanlarında protektif antijen saptanmasını amaçladık.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmamızda, protektif antijen IgG antikoru varlığının saptanması amacıyla ELISA (Enzyme Linked Immünosorbent Assay, Biosource, ABD) yöntemi kullanılmıştır.*

Bulgular: *Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi ve Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne gelen şarbon şüpheli 47 hastadan alınan örneklerin 35'inde B. anthracis PA IgG pozitif bulundu. Pozitif sonuçlu 35 hastanın 6'sı kadın (%17.1), 29'u (%82.8) erkek hastalardan oluşmaktadır. Otuz beş hastanın 27'si (%77.1) hayvancılıkla uğraşırken, 8'inin (%22.8) hayvancılıkla uğraşmayan hayvan etiyle temas öyküsü bulunan kişiler olduğu görülmüştür.*

Sonuç: *Klinik bulguları şarbonu gösteren fakat kanlarında protektif antijen IgG'leri bulunamayan kişilerin negatif çıkan sonuçlarını, hastaların hastanemize başvurmadan önce çeşitli sağlık kuruluşlarında tedavi almalarına, Doğu Anadolu gibi kırsal bölgelerde antibiyotiklerin her hastalığı tedavi eder düşüncesiyle rastgele alınmasıyla bakterinin toksin oluşturma yeteneğinin kırılmasına ya da örneklerin alındığı sırada henüz kanda dolaşan PA varlığının saptanamayacak düzeyde az olmasına bağlamaktayız.*

Anahtar kelimeler: *Bacillus anthracis, seroprevalans, protektif antijen*

ABSTRACT

A Research on the Anthrax Agent and Its Seroprevalance in the Eastern Anatolia Region

Objective: *Anthrax, is a lethal bacterial zoonosis transmitted through skin, inhalation or gastrointestinal tract, and spread by herbivorous animals particularly with cattle and sheep. One of the fundamental virulence factors of Bacillus anthracis is its toxins consisting of protective antigen (PA), edema factor and lethal factor. The protective antigen is especially responsible for intracellular entrance of the other two factors. The aim of the present study is to investigate the protective antigen in blood samples of patients who applied to the hospitals in our region with a suspected anthrax infection, and to determine the prevalence in the region.*

Material and Methods: *ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Biosource, USA) method was used in the study in order to detect the presence of the protective antigen IgG antibody.*

Results: *We determined 35 Bacillus anthracis protective antigen IgG positive results out of 47 samples taken from patients suspected of anthrax in Ataturk University Yakutiye Training and Research Hospital and Erzurum Regional Training and Research Hospital. Thirty-five (6 female: 17%, and 29 male:82.8%) patients had positive results. Out of 35 patients 27 (77.1%) were into animal husbandry, 8 patients (22.8%) were not involved in animal husbandry but had a history of contact with animal flesh.*

Conclusion: *We have attributed the results obtained from the samples taken from patients, who had clinical findings of anthrax but without protective antigens in their blood to medical treatments they received in various health institutes before they applied to our hospital, to random use of antibiotics relying on the common tendency that antibiotics can cure any disease, impairment of toxin-producing ability of the bacteria, drawal of blood samples when protective antigen levels in the circulation decreased to undetectible levels.*

Keywords: *Bacillus anthracis, seroprevalence, protective antigen*

Alındığı tarih: 04.07.2017
Kabul tarihi: 04.10.2017
Yazışma adresi: Çiğdem Eda Balkan, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars
e-posta: cigdemedabalkan@gmail.com

GİRİŞ

Bacillus anthracis '"*Bacillus*" cinsinin bir üyesidir. Bu cinsin diğer türleri; *B. cereus, B. mycoides, B. thuringiensis, B. megaterium* ve *B. subtilis*'tir. Şarbonun etkeni olan *B. anthracis*; Gram pozitif, aerobik veya fakültatif aerobik, hareketsiz basil şeklinde 1 µm ile 8 µm arası büyüklükte olabilen merkezi silindirik sporlu bir bakteridir[1].

Şarbon; *B. anthracis* endosporlarının vücuda deri, solunum ya da gastrointestinal yolla girmesiyle oluşan özellikle otçul hayvanların içinde bulunduğu bir grupla yayılan, ölümcül bakteriyel bir zoonozdur[2]. İnsan bulaşı kontamine hayvanlar ya da hasta hayvanın ürünleriyle temasla gerçekleşir, henüz insandan insana geçen bir olgu görülmemiştir. Temel olarak şarbon; akciğer, kutanöz (deri) ve gastro-intestinal olmak üzere üç klinik formda görülür. Olguların çoğunluğu kutanöz şarbon şüphesiyle hastaneye başvururken az sayıda akciğer ve gastrointestinal şarbon olguları dabildirilmektedir. Kutanöz şarbon genellikle tadavi edilebilir olmakla beraber nadiren ölümcül olabilir. Gastrointestinal şarbonda ise bakteriyemi ve toksemi olduğu durumlarda yine olguların neredeyse %51-75'i hipotansiyon ve şok sonucu yaşamını kaybetmektedir[3]. Akciğer şarbonun da ise durum daha ciddidir. Bakteriyel endosporların solunmasıyla oluşan olguların neredeyse tamamı, semptomların başlamasıyla birlikte birkaç gün içinde ölümle sonuçlanmaktadır[2-4].

Batı Afrika dünyanın en çok etkilenen bölgesi olmakla beraber aynı zamanda Afrika'nın kalan kısmı, Amerika, İspanya, Yunanistan, Türkiye, Arnavutluk, Romanya, Asya ve Ortadoğu'da da *B. anthracis* önemli bir sorun olarak görülmektedir[5].

CDC (Centers for Disease Control and Prevention)'ye göre *B. anthracis*, ölümle sonuçlanan olguların sayısı sebebiyle, yüksek derece biyotetörizm ajanları listesinde yer almaktadır[4]. Dünya çapında meydana gelen saldırılar, şarbon etkeni olan *B. anthracis*'in biyolojik silah olarak kullanıldığını göstermiştir[5,6].

Bacillus anthracis prokaryotların bazıları gibi besinlerin yetersiz olduğu ve çevre koşullarının uygun olmadığı durumlarda sporlanır[7]. Sporlanan *B. anthracis*'in kalın protein tabakası genetik materyalini ağır kimyasallar ve çevre koşullarına karşı korur[8]. Yüksek sıcaklıklar, UV, pH farklılıkları, toksik kimyasallar sporları öldürmede ineffektiftir ve bu durum sporlu bakterileri bilinen en dirençli yaşam formu yapar[9]. *B. anthracis* dormant halde yıllarca yaşayabildiği gibi besin maddelerinin bulunduğu ortamda vejetatif hâle geçerek metabolik aktivitesini yeniden kazanır[10].

Bakterilerin çoğalması amino asit, şeker, pürin nükleotidlerinin ortamda bulunmasıyla başlayan, dipikolinik asidin spordan çıkmasıyla devam eden ve spora su girişiyle tamamlanan bir süreçle olur[11]. Spor rehidrate olduğu andan itibaren metabolizması aktive olarak makromoleküllerin sentezlenmesiyle birlikte artık bakteri toksin salgılamaya ve enfeksiyon oluşturmaya hazır hâle gelir[5,12].

Şarbon enfeksiyonu, gram pozitif toprak mikroorganizması olan *B. anthracis*'in endosporları ile oluşur bu endosporlar çoğalamazlar, kimyasallara ve çevre koşullarına karşı oldukça dirençlidirler[13]. Bakterinin vücuda girdiği andan itibaren sporlar vejetatif forma dönerek virulan hâle geçer ve toksinlerini vücuda salarlar[14].

Deri şarbonu olarak da bilinen kutanöz şarbon, olguların %95'ini oluşturmaktadır[15]. Hastalık ağırlıklı olarak çiftliklerde hayvan besleyen ve ürünleriyle temas eden kişilerde oluşmaktadır[16]. Enfeksiyon *B. anthracis* sporlarının aşınmış ya da kesik dokudan derialtına girmesiyle oluşur[16]. Kuluçka süresi 1-12 gün arasında değişir, enfek-

siyon sporun girmesinin ardından vejetatif forma geçmesiyle birlikte ciltte oluşan ağrısız, kaşıntılı ve düzensiz kenarlı bir yaradır[3,16]. Şarbon yarasının majör teşhis kriteri; morumsu vezikül şeklinde görülen yara ve ödem oluşumudur (Çoban çıbanı) [5].

Gastrointestinal şarbon gelişmiş ülkelerde çok ender görülmekle beraber, enfekte olmuş kişilerdeki ölüm oranı %25 ile %60 arasında seyreder[5]. Enfeksiyon kontamine et ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile 2-5 gün içinde başlar[14,15]. Enfeksiyona eşlik eden belirtiler; nöbet, kuvvet kaybı, düşük ateş, karın ağrısı, mide bulantısı, kusma, peritonal kavitede sıvı birikmesi ve baş ağrısıdır[16]. Medikal girişim genelde ölüm oranlarını azaltmaktadır ama teşhisin geç olması ölüm oranını arttırır[5,17].

İnhalasyon şarbonu olarak bilinen akciğer şarbonu *B. anthracis* sporlarının solunumla alınarak alveollere ulaşmasıyla meydana gelir[1]. Bir savunma mekanizması olarak alveolar makrofajlar sporları alarak mediastinal lenf nodlarına taşır, makrofajlarda sporlar vejetatif hâle geçerek çoğalmaya başlar ardından toksin salgılarlar ve bakteri makrofajları lizise uğratarak lenfatik sisteme geçer[15]. Septisemi ya da bakteriyemi ile birlikte hastalık kısa sürede ölümle sonuçlanır[5,6].

Hastalara penisilin G (Benzilpenisilin), streptomisin, tetrasiklin, doksisiklin, eritromisin laktobiyonat, kloramfenikol, siprofloksasin gibi antibiyotikler verilir[1]. *B. anthracis*'in iki majör virulans faktörü vardır; bunlar şarbon toksinleri ve poli-d-glutamik asit yapısındaki kapsülüdür[18]. Konak hücrelerde geniş etkilere sahip olan protektif antijen (PA), ödem faktör (EF) ve letal faktör (LF) *pXO1* geni tarafından kodlanır[19,20]. *pXO2* ise kapsülü kodlayan gen bölgesidir ve kapsül yapısı bakteriyi fagositozdan korur[21].

Ödem faktör kalmodulin bağımlı adenilat siklazdır; ATP'yi cAMP'ye çevirir[22]. cAMP'nin bu yükselişini dokularda sıvı birikmesi ve ödem oluşumu takip eder[23]. Yapılan çalışmalarda, ödem toksininin hücrelerde şarbon toksin reseptörlerini arttırdığı, hücreleri daha çok protektif antijenin bağlanması yönünden uyardığı ve böylece hücrelere giren toksin miktarının artmasına neden olduğu bilinmektedir[24].

Letal faktör toksik etkisini, immun sistemin patojenleri inaktive ettiği mitojenle aktive olmuş protein kinase (MAPK) yolağını bozarak gösterir[25-27]. Letal faktör aynı zamanda immun sistemin birçok hücresinin potansiyel inhibitörüdür, örneğin, makrofajların ve dendritik hücrelerin sitokin salgılamasını da inhibe eder[28,29].

Bacillus anthracis'in toksinleri *pXO1* gen bölgesi tarafından kontrol edilir[30]. Bu toksinler EF, LF ve protektif antijendir ve bu üç proteinin tek başlarına herhangi bir toksik etkileri yoktur[31,32]. Toksinler AB toksin yapısında oldukları için kanda ya da konak hücrede bir araya geldiklerinde etkilerini beraber gösterirler[33]. PA konak hücreye saldırarak EF ve LF'nin gireceği bir delik açar, PA bazı hayvanlardaki koruyucu immunitenin de temelini oluşturur bu özelliğiyle şarbon aşısının önemli bir komponentidir[34].

GEREÇ ve YÖNTEM

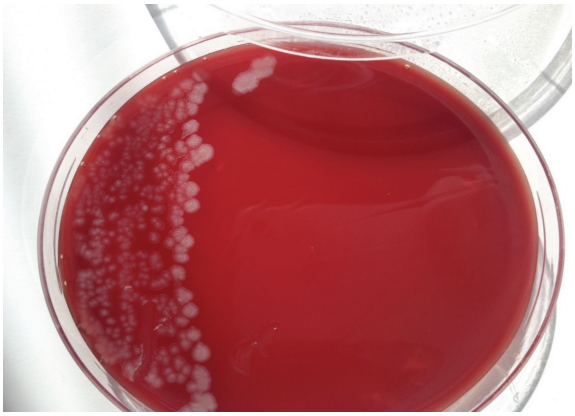
Çalışmamızda PA'nın varlığının saptanması amacıyla indirek ELISA yöntemi kullanılmış, hayvanlarla teması olan ve klinik şüpheli belirti gösteren hasta serumlarında protektif antijen IgG antikoru varlığı araştırılmıştır. Bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 24.07.2014 tarih, 8 no toplantı ve 29 no kararı ile onay almıştır.

Çalışmamıza, hastanemize ve çevre hastanelere şarbon şüphesiyle başvuran 47 kişiden kan örnekleri alınmıştır. Çalışma prosedürüne göre alınan örnekler 2-8°C'de yedi güne kadar ya

da dondurularak altı ay saklanabilmektedir. Bir yıllık süre zarfında toplanan örnekler dondurularak bu şekilde testin çalışılacağı zamana kadar biriktirilmiş hasta serumları iki grup hâlinde çalışılmıştır (Şekil 1). Hasta serumları mikro ELISA cihazı (AluRad Allisei QS, İtalya) cihazı kullanılmış. Şarbon Protective Antijen IgG'si ELISA kiti (Biosource, ABD) ile hasta serumlarında, protektif antijenlere karşı oluşmuş immünglobulin G'ye bakılmıştır.

Erzurum merkezden başlayarak çevre il ve ilçelerden gelen hastaların anamnezleri alındı. Hastaların 35'inde protektif antijen IgG'si pozitif bulunurken, 12 hastanın sonucu negatif saptandı. Besledikleri hayvanlar ve hayvanların bulunduğu ortamlardan alınan sürüntü örnekleri kanlı agara ekildi ve gram boyalı preparatlar hazırlandı.

Hastalardan alınan bül sıvılarından gram boyama ve ekimler yapıldı. Ekim sonrasında 37°C'de 24 saat içinde üreyen koloniler tek koloni ekimi ile saflaştırıldı (Şekil 2).



Şekil 2. Bül sıvılarından alınan örneklerden pasaj ile *Bacillus anthracis* üretilmiş kanlı agar plağının görüntüsü.

BULGULAR

Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi ve Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne gelen şarbon şüpheli 47 hastadan 35'inde *B. anthracis* protektif antijeni ELISA testi ile yapılan çalışmada pozitif bulundu.

Şarbon şüphesiyle başvuran hastalar incelendiğinde:

1. Kırk yedi şüpheli hastanın tamamı klinik bulgu şüphesiyle hastanelere merkez, çevre il, ilçe ve köylerden başvurmuştur.

Şekil 1. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne kutanöz şarbon şüphesiyle gelen hastalar.
A) İlk hasta 29 yaşında kurban kesimi sırasında açık yarasına dokunan 29 yaşında bir kadın.
B) Şarbonlu hayvanlarla temas eden 6 yaşında erkek çocuk.
C) Hayvan kesimine yardım ederken gözüne temas eden 54 yaşında kadın hasta.

Tablo 1. Protektif antijen IgG pozitif sonuçlu hastaların dağılımı.

Kadın				Erkek			
Çocuk		Erişkin		Çocuk		Erişkin	
Hayvancılıkla Uğraşan	Hayvancılıkla Uğraşmayan	Hayvancılıkla Uğraşan	Hayvancılıkla Uğraşmayan	Hayvancılıkla Uğraşan	Hayvancılıkla Uğraşmayan	Hayvancılıkla Uğraşan	Hayvancılıkla Uğraşmayan
2	0	2	2	4	0	19	6

2. Kırk yedi şüpheli hastanın (n:35) %74.4'ünde protektif antijen IgG'si pozitif bulunurken, (n:12) %25.5'i negatif bulunmuştur (on yedi şüpheli erişkin hayvancılıkla uğraşan erkek hasta negatif sonuç vermiştir).
3. Bu şüpheli 47 hastanın (n:41) %87.2'si erkek hasta iken, (n:6) %12.7'si kadın hastadır.
4. Bu hastaların 35'inde *B. anthracis* protektif antijeni pozitif bulunmuştur.
5. PA pozitif sonuçlu 35 hastanın 6'sı kadın (%17.1), 29'u (%82.8) erkek hastalardan oluşmaktadır.
6. PA pozitif sonuçlu 35 hastanın 27'si (%77.1) hayvancılıkla uğraşırken, 8'i (%22.8) hayvancılıkla uğraşmayan fakat hayvan etiyle temas öyküsü bulunan kişilerdir.
7. Hayvancılıkla uğraşan bazı hastalarımızın ahırlarından ve meralarından aldığımız örneklerde ise *Bacillus* cinsi bakteriler üretilemedi.
8. Kırk yedi hastadan alınan bül örneklerinin yaymalarından 31'inde Gram (+) çomak bakterilere rastlanırken, kanlı agara yapılan ekimlerde plakların 23'ünde hemolizsiz, kuru formda, mat, beyaz rengi andıran, kenarları düzensiz R tipi koloniler gözlemlendi. Bu koloniler, yakından incelendiğinde, merkezden perifere doğru oluşan dalgalı ipliksi görünümünden dolayı ondülan saça benzer tipik koloniler görüldü. Bunun yanı sıra birçok plakta Gram (-) ve Gram (+) çeşitli bakterilerin üremelerine rastlandı. Şekil 2'de resimde görülen koloniler şüpheli kolonin saf olarak pasajlanması ile elde edilmiştir. Üreme olan plaklardan gram boyama yapılarak bambu kamışı görünümünde Gram pozitif basillere rastlanmıştır.
9. Mevsimsel olarak sonuçlarımızda; Haziran-Ağustos ayları arasında ELISA testinde PA sonucu; 29 hastanın 27'sinde pozitif bulundu, Eylül-Kasım ayları arasında 11 hastanın 5'i, PA pozitif bulundu ve diğer ayların tümünde toplamda 7 örnekten 3'ü, PA pozitif olarak bulundu (PA olarak belirtilen sonuç Protektif Antijen IgG sonucudur.).

TARTIŞMA

Şarbon Türkiye'de özellikle geleneksel hayvancılığın yapıldığı alanlarda bilinen bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda, enfeksiyonun kadınlarda ve erkeklerde eşit oranlarda gözlendiği ve herhangi bir yaş grubunda da görülme sıklığının diğerinden fazla olmadığı belirtilmiştir[35]. Çalışmamızda da, bu oran diğer yayınlardaki gibi olmakla beraber hayvancılıkta ve hayvan kesiminde özellikle erkeklerin başrol oynamasından dolayı, şarbon şüphesiyle gelen 47 hastanın 41'i erkek hastalardı.

Epidemiyolojik çalışmalar ELISA ile PA, LF ve EF'nin saptanması üzerinedir. Çalışmamızda da, şarbon şüphesiyle gelen hastalarda protektif antijen IgG varlığına bakılmıştır. Çalışmamızdaki sonuçlara göre 47 hastanın 34 (%74.4)'ün de PA pozitif bulundu. PA negatif hastaların klinik belirtilerinin olmasını, hastaların hastanelerimize başvurmadan önce çeşitli sağlık kuruluşlarında tedavi almasına ya da Doğu Anadolu gibi kırsal bölgelerde antibiyotiklerin her hastalığı

tedavi eder düşüncesiyle rastgele ve hemen alınması neticesinde bakterinin toksin oluşturma yeteneğinin kırılmasına ya da örneklerin alındığı sırada henüz kanda dolaşan PA varlığının saptanamayacak düzeyde az olmasına bağlamaktayız.

Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı'ndan ulaştığımız Türkiye verilerine bakıldığında ise 2010-2014 yılları arasındaki şarbon olgularının dağılımında, 2010 yılında 94 hasta, 2011 yılında 165 hasta, 2012 yılında 135 hasta, 2013 yılında 197 hasta, 2014 yılında 150 hasta bildirilmiştir.

Çalışmamızın yapıldığı Doğu Anadolu bölgesindeki şarbon olgularının azalmasının Türkiye totalindeki azalma ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hastanemize son yıllarda şarbon şüphesi ile başvuran hastalarda periyodik bir azalma olduğu hastane kayıtlarından anlaşılmaktadır. Bu azalmayı bölge halkının enfeksiyon ve mikroplar hakkında bilinçlenmesine ve şehir ve kırsal alandaki yaşam şartlarının modernleşmesine bağlamaktayız.

Enfeksiyon insanlara enfekte hayvanlardan direk ya da dolaylı yoldan bulaşabilir. Endüstriyel olarak bulaşı, enfekte *B. anthracis* sporları ile kontamine kıl, yün, deri gibi hayvansal ürünlerin sanayide işlenmesi sırasında oluşur. Hastaların anamnezlerine bakıldığında çalışmamızda bu yol ile bulaş görülmemiştir. Erzurum ve çevresinde yapağı (yün) ve hayvan deri işleme atölyelerinin son yıllarda tamamen yok olmasa bile yok denilecek kadar az sayıya düşmesi ve dericiliğin yerini yapay derilerin almasının bölgemizde de endüstriyel kaynaklı şarbonun bu denli azalmasına neden olduğu düşünülmektedir.

İkinci bir bulaş şekli olan tarımsal bulaşta risk grubu; hayvancılıkla uğraşanlar, kasaplar, veteriner hekimler ve ender olarak hasta hayvana temas eden hayvancılıkla ilgisi olmayan kişilerdir[36]. Çalışmamızdaki hastaların tamamı bu gruplar içerisinde yer almaktadır.

Bir üçüncü bulaş yöntemi laboratuvar kaynaklı bulaştır. 1979'da, Sverdlovs Rusya'da 96 kişiyi enfekte eden ve 64 kişinin ölümüyle sonuçlanan salgın bu yolla bulaşa bir örnektir[37].

Çalışmamız sırasında taradığımız literatürlerde bu tür bulaşın ülkemizde rapor edilmediğini gördük ya da varsa da gözümüzden kaçmış olabileceği düşüncesindeyiz. Buna karşılık Erzurum ve çevresinde son on yılda hastanelere bu tür bulaşlı bir hastanın başvurduğunun kayıtlarda görülememesinin Türkiye literatürüne uyumlu olduğu düşüncesindeyiz.

Bacillus anthracis'in mevsimsel dağılımına bakıldığında ülkemizde özellikle sonbahar ve yaz mevsiminde daha yoğunlukta olduğu görülmektedir[38-40].

Örneklerimiz bir yıl süresince gelen şarbon şüpheli 47 hastadan alınmıştır. Bu örneklerin 35'inin PA'ni pozitif bulunmuştur. Otuz beş PA pozitif örnekten 27 (%77.1)'si Haziran-Ağustos ayı süresince, 5 (%14.2)'i Eylül-Kasım aylarında pozitif bulunurken, diğer aylarda ise 3 (%8.5) örnek pozitif olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarla paralel doğrultuda olup, şarbonun sonbahar ve yaz aylarında pozitifliğinin daha üst düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu durumu mera ve otlaklardan beslenen hayvanların özellikle yaz aylarında dikenli bitkilerle beslenerek ağız yaraları yoluyla sporları almış olabileceğine bağlamaktayız.

Özden ve ark.'nın[41] Erzurum'da yaptığı çalışmada, 44 deri şarbon olgusunun 24'ü erkek (%54.5), 20'si kadın (%45.5) olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda da şarbon şüphesiyle başvuran 47 hastanın 41'inin erkek (%87.2), 6'sının kadın hasta (12.7) olduğu görüldü. Yöremizde yapılan çalışmalarda, hayvancılığın yoğun yapıldığı bölgemizde dahi kadın ve erkeklerin şarbon olgusu olgularında bir korelasyon olmadığı ama çiftçi ve ev hanımları arasında daha yoğun olarak sap-

tandığı gözlemlenmektedir.

Çalışmamızda da önceki çalışmaları destekler nitelikte hastaların büyük çoğunluğunun hayvancılıkla uğraşan erkeklerden, et kesiminine yardım eden çocuk ve kadınlardan oluştuğu görülmüştür.

Bacillus anthracis'in in vitro birçok antimikrobiyale duyarlı olduğu bilinmektedir. Penisilinler hâlâ enfeksiyonda ilk yeğlenecek antibiyotiktir. Penisilin allerjisi olan kişilerde, eritromisin, tetrasiklinler, kloramfenikol ve birinci kuşak sefalosporinler diğer seçenekler arasındaki antibiyotiklerdir[1,42,43].

Çalışmamızda, belirtilen sonuçlara ve hasta anamnezlerine bakıldığında hasta hayvanlar ile temas hâlinde olan kişilerde cilt şarbonu şüpheli bulgular görüldü. Hastalarda protektif antijen IgG tayini, direkt bakı ve kültürle *B. anthracis*'in etken olduğu belirlendi. Sonuçlarda, protektif antijeni negatif çıkan fakat şarbon bulguları olan hastalara da klinikle iletişime geçilerek tedavileri başlatıldı. Yine bu kişilerden alınan örneklerden oluşan negatifliğin hastaların henüz kan örnekleri alınmadan önce başlanan tedaviden kaynaklı oluştuğu düşünülmektedir. Hastalığın sıklığı hayvan beslenmesi ile uğraşan kişilerin hayvanlarının aşılarına dikkat etmeleri gerektiğini göstermektedir. Şarbon şüpheli hayvanları olan kişileri gerekli birimlere ulaşması konusunda bilgilendirmek önem göstermektedir.

Çalışmamız hastalıkla ilgili toplumsal bilgilendirmelerin özellikle hayvancılığın giderek geliştiği bölgemizde şarbonu bölgeden tamamen eradike etmek için zorunlu olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur.

Hastalardan örnek alınmadan önce antibiyotik kullanmaları altın standart olan etkenin üretilmesini engelleyebilmektedir. Bu nedenle hastada oluşan herhangi bir spesifik antikorun belirlenip, doğrulanması tanı için önem açısından ilk sıraya yerleşmektedir. Klinik olarak şarbon kabul edilen 47 hastanın 35'inde PA saptanırken, yalnız 31'inde Gram pozitif basillere rastlanması, 23'ünde *B. anthracis*'in üretilmesi, geri kalan 12 hastada üretilememesi oldukça önemlidir. Bu da göstermektedir ki günümüzde pahalı olmasına rağmen, şarbon şüpheli hastalarda EF, LF ve özellikle PA saptanması tanı, tedavi ve hastalığın atlanmaması açısından önemi azımsanmayacak bir yoldur.

KAYNAKLAR

1. Koehler TM. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. Mol Aspects Med. 2009;30(6):386-96. https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.004
2. Hanna P. Anthrax pathogenesis and host response. Curr Top Microbiol Immunol. 1998;225:13-35. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80451-9_2
3. Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC. Anthrax. N Engl J Med. 1999;341(11):815-26. https://doi.org/10.1056/NEJM199909093411107
4. Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, et al. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. Science. 1994;266(5188):1202-8. https://doi.org/10.1126/science.7973702
5. Oncu S, Oncu S, Sakarya S, Anthrax an overview. Med Sci Monit. 2003;9(11):RA276-83.
6. Bush LM, Abrams BH, Beall A, Johnson C. Index case of fatal inhalational anthrax due to bioterrorism in the United States. N Engl J Med. 2001;345(22):1607-10. https://doi.org/10.1056/NEJMoa012948
7. Giorno R, Bozue J, Cote C, et al. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. J Bacteriol. 2007;189(3):691-705. https://doi.org/10.1128/JB.00921-06
8. Atrih A, Foster SJ. Bacterial endospores the ultimate survivors. Int Dairy J. 2002;12(2-3):217-23. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00157-1
9. Nagarajan R, Muller WS, Ashley R, Mello CM. In Decontamination Of Bacterial Spores by a Peptide-Mimic, 25th Army Science Conference, Orlando, Aralık 2006.
10. Driks A. The *Bacillus anthracis* spore. Mol Aspects Med. 2009;30(6):368-73. https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.08.001
11. Setlow P. Spore germination. Curr Opin Microbiol. 2003;6(6):550-6. https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001
12. Indest KJ, Buchholz WG, Faeder JR, Setlow P. Workshop report: modeling the molecular mechanism of bacterial spore germination and elucidating reasons for germination heterogeneity. J Food Sci. 2009;74(6):R73-8. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01245.x
13. Kohout E, Sehat A, Ashraf M. Anthrax: a continous problem in Southwest Iran. Am J Med Sci.

1964;247:565-75.
https://doi.org/10.1097/00000441-196405000-00006
14. Paola A. Investigation of the biological and physicochemical properties of *Bacillus anthracis* spores during germination, virulence, and killing. Biyomoleküler Mühendisliği. Doktora Tezi Worchester: Worchester Politeknik Enstitüsü, 2012.
15. Pile JC, Malone JD, Eitzen EM, Friedlander AM. Anthrax as a potential biological warfare agent. Arch Intern Med. 1998;158(5):429-34.
https://doi.org/10.1001/archinte.158.5.429
16. Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, et al. Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. JAMA. 1999;281(18):1735-45.
https://doi.org/10.1001/jama.281.18.1735
17. Kanafani ZA, Ghossain A, Sharara AI, Hatem JM, Kanj SS. Endemic gastrointestinal anthrax in 1960s Lebanon: clinical manifestations and surgical findings. Emerg Infect Dis. 2003;9(5):520-5.
https://doi.org/10.3201/eid0905.020537
18. Ketelaar T, Voss C, Dimmock SA, Thumm M, Hussey PJ. *Arabidopsis* homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. FEBS Lett. 2004;567(2-3):302-6.
https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.088
19. Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. Infect Immun 1983;39(1):371-6.
20. Xu L, Frucht DM. *Bacillus anthracis*: a multi-faceted role for anthrax letal toxin in thwarting host immune defenses. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):20-4.
https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.08.010
21. Newburger PE, Speier C, Stock JL, Perrine SP, Greenberger JS. Chediak-Higashi syndrome: studies in long-term bone marrow culture. Exp Hematol. 1985;13(2):117-22.
22. Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(10):3162-6.
https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.3162
23. Firoved AM, Miller GF, Moayeri M, et al. *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. Am J Pathol. 2005;167(5):1309-20.
https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61218-7
24. Maldonado-Arocho FJ, Fulcher JA, Lee B, Bradley KA. Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. Mol Microbiol. 2006;61(2):324-37.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05232.x
25. Bodart JF, Chopra A, Liang X, Duesbery N. Anthrax, MEK and cancer. Cell Cycle. 2002;1(1):10-5.
https://doi.org/10.4161/cc.1.1.95
26. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature. 2001;410(6824):37-40.
https://doi.org/10.1038/35065000
27. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. Mol Cell Biol. 1999;19(4):2435-44.
https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2435
28. Ribot WJ, Panchal RG, Brittingham KC, et al. Anthrax lethal toxin impairs innate immune functions of alveolar macrophages and facilitates *Bacillus anthracis* survival. Infect Immun. 2006;74(9):5029-34.
https://doi.org/10.1128/IAI.00275-06
29. Tournier JN, Quesnel-Hellmann A, Mathieu J, et al. Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. J Immunol. 2005;174(8):4934-41.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4934
30. Green BD, Battisti L, Koehler TM, Thorne CB, Ivins BE. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. Infect Immun. 1985;49(2):291-7.
31. Beall FA, Taylor MJ, Thorne CB. Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 1962;83:1274-80.
32. Stanley JL, Smith H. The three factors of anthrax toxin: their immunogenicity and lack of demonstrable enzymic activity. J Gen Microbiol. 1963;31:329-37.
https://doi.org/10.1099/00221287-31-2-329
33. Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 2004;68(3):373-402.
https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.373-402.2004
34. Strange RE, Thorne CB. Further purification studies on the protective antigen of *Bacillus anthracis* produced in vitro. J Bacteriol. 1958;76(2):192-202.
35. Kaya A, Tasyaran MA, Erol S, Ozkurt Z, Ozkan B. Anthrax in adults and children: a review of 132 cases in Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002:21(4):258-61.
https://doi.org/10.1007/s10096-002-0704-6
36. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü İstatistik Yıllıkları (http://www. saglik.gov. tr) Bakteri Enfeksiyonları Kitabı, 2.cilt, 2105.
37. Anthrax in Human and animals WHO Guidance. http:// www.who.int/csr/ resources/publications/Anthrax _ web.pdf. (Erişim tarihi:14.02.2016)
38. Doğanay M. Şarbon. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:7, 1986.
39. Doğanay M. Human anthrax in Turkey. Salisbury Med Bull. 1995;87:8.
40. Kaya A, Taşyaran MA, Özkurt Z, Yılmaz Ş. Şarbon: 68 olgunun değerlendirilmesi. Flora. 1997;2:51-4.
41. Özden K, Özkurt Z, Erol S, Uyanık MH, Parlak M. Cutaneous anthrax patients in Eastern Anatolia, Turkey: a review of 44 adults cases. Turk J Med Sci. 2012;42(1):39-45.
42. Doğanay M, Aydın N. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. Scand J Infect Dis. 1991;23(3):333-5.
https://doi.org/10.3109/00365549109024319
43. Lightfoot NF, Scot RCD, Turnbull PCB. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. Salisbury Med Bull. 1990;68:95.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):60-65
doi:10.5222/TMCD.2018.060

Araştırma

Hepatit B Virüs ile Kronik Enfekte Hastalarda HBsAg Düzeyinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Seda TEZCAN ÜLGER*, Nuran DELİALİOĞLU*, Özlem KANDEMİR, Havva Didem OVLA ÇELİKCAN*****

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

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

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

ÖZ

Amaç: *Kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonunun tanı ve izlenmesinde serum HBV DNA düzeyi virus replikasyonunun en yaygın göstergesi olup, serolojik belirteçler ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyinin ölçümü ile birlikte yaygınlıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda ise, kantitatif HBsAg düzeyleri ile HBV DNA ve ALT düzeylerinin ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, KHB hastalarında kantitatif HBsAg seviyelerinin HBV DNA, ALT-AST seviyeleri ve HBeAg ile karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmaya dâhil edilen 91 KHB'li hastanın HBV DNA düzeyleri, gerçek zamanlı PCR yöntemi (Cobas TaqManTM 48, Roche, Almanya) ile araştırıldı. Kantitatif HBsAg ölçümü ELISA yöntemi (Architect i2000SR, Abbott, Almanya) ile 0.05-250 IU/mL limit aralığında gerçekleştirildi.*

Bulgular: *Hastaların, HBV DNA seviyesinin ortancası 1538.50 (19.00-64501284.00), kantitatif HBsAg değerinin ortancası 2210.06 (0.05-46192.95) olup, HBsAg ölçüm değerleri ile HBV DNA düzeyleri arasındaki doğrusal korelasyon istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Ayrıca HBeAg pozitif hastalarda kantitatif HBsAg düzeyleri, HBeAg negatif hastalardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).*

Sonuç: *HBsAg'nin kantitatif ölçümü ile HBV DNA düzeyi arasındaki korelasyon, kantitatif HBsAg ölçümünün, KHB hastalarında HBV-DNA'nın yanında replikasyonu izlemek için tamamlayıcı ek bir belirteç olabilir. ALT düzeyi normalden yüksek olan hastalarda ise yüksek HBV DNA ve HBsAg düzeyleri nedeni ile kantitatif HBsAg ölçümü KHB'li hastaların izlenmesinde göz önünde bulundurulabilir.*

Anahtar kelimeler: *Kronik hepatit B, kantitatif HBsAg, HBV DNA*

ABSTRACT

Quantitative Determination of HBsAg Levels in Chronically Infected Patients with Hepatitis B Virus

Objective: *Serum HBV DNA levels is the most common sign for virus replication in diagnosis and follow-up of patients with chronic hepatitis B (CHB) infection and it has been prevalently used with serologic markers and aminotransferase (ALT) levels. In recent years, it has been shown that HBsAg levels are associated with HBV DNA and ALT levels. In this study, it was aimed to investigate the quantitative HBsAg levels and to compare it with HBV DNA level, ALT-AST levels and HBeAg in CHB patients.*

Material and Methods: *HBV DNA levels of 91 patients with CHB were measured with real-time PCR method (Cobas TaqMan TM, Roche Laboratories, Germany). Quantitative HBsAg assays were performed with the ELISA method (Architect i2000 SR, Abbott Laboratories, Germany) within a range of 0.05-250 IU/mL.*

Results: *The median HBV DNA level was determined as 1538.50 (19.00-64 501 284.00) and the median HBsAg was 2210.06 (0,05-46 192,95). The correlation between HBsAg and HBV DNA levels was found statistically significant ($p=0.05$). In addition, quantitative HBsAg levels in HBeAg positive patients were found to be significantly higher relative to HBeAg negative patients ($p<0.05$).*

Conclusion: *The correlation between the quantitative levels of HBsAg and the HBV DNA level, quantitative HBsAg measurement may be an additional complementary marker for monitoring replication of HBV DNA in patients with CHB as well as HBV-DNA. In patients with elevated ALT levels, quantitative HBsAg measurement can be considered in the follow-up of CHB patients because of their high HBV DNA and HBsAg levels.*

Keywords: *Chronic hepatitis B, quantitative HBsAg, HBV DNA*

Alındığı tarih: 10.07.2017
Kabul tarihi: 03.11.2017
Yazışma adresi: Seda Tezcan Ülger, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü 33343 Mersin
e-posta: tezcanseda@yahoo.com

GİRİŞ

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu hâlen dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olup, yaklaşık 250 milyon kişi kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonuna yakalanmakta[1] ve her yıl neredeyse 1 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır[2]. HBV enfeksiyonu, akut kendini sınırlandıran hastalık ve inaktif taşıyıcılıktan kronik karaciğer hastalığı, siroz ve hepatoselüler karsinomaya kadar ilerleyen olukça geniş spekturumda klinik görünüme neden olmaktadır[3]. Türkiye HBV enfeksiyonu yönünden orta endemisiteye sahip bir ülke olup, HBsAg pozitiflik oranı %0.8-5.7 arasında yer almaktadır. Bu nedenle, KHB hastalarının tedavi ve izlenmesi büyük önem taşımaktadır[4].

HBV zarflı, yaklaşık 3.2 kb uzunluğunda kısmen çift zincirli bir DNA virusudur. HBV genomu 4 adet üst üste binen açık okuma çerçevesine (open reading frame, ORF) sahiptir, bunlar; pol (P), env (E), core (C) ve X'dir[5]. KHB enfeksiyonunun tanısında ve takibinde virus tarafından kodlanan antijenler ve bunlara karşı oluşan antikorları gösteren serolojik belirteçler (hepatit B yüzey antijeni ve antikoru [HBsAg, anti-HBs], hepatit B e antijeni ve antikoru [HBeAg, anti-HBe], hepatit B kor antijenine karşı oluşan antikorlar [anti-HBc]), viral yük ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyinin ölçümü sıklıkla kullanılan yöntemlerdir[6]. HBV DNA kantitasyonu, uygun tedavi tipinin değerlendirilmesinde, viral replikasyonun göstergesi olarak yaygınlıkla kullanılmaktadır[7]. HBsAg'nin moleküler virolojisinin anlaşılması ile HBsAg'nin serum konsantrasyonunun, karaciğer hepatositleri içindeki integre viral genlerin transkripsiyon kalıbı olarak görev gören cccDNA miktarını yansıttığı ileri sürülmektedir[7,8]. Bu nedenle dolaşımda sirküle olan HBsAg seviyelerinin viral replikasyon düzeyini tahmin ettirerek hastalık aktivitesinin ve antiviral tedaviye yanıtın belirlenmesinde kullanıldığı ileri sürülmektedir[9].

Son yıllarda ise, KHB'de, serum HBsAg seviyelerinin hastaların hastalık aktivitesi ile antiviral ve interferon temelli tedaviye yanıtının değerlendirmesinde iyi bir gösterge olabileceği ve serum HBV DNA düzeyleri ile iyi ilişkisi gösterilmiştir[8,10,11]. Bu çalışmada, HBV ile kronik olarak enfekte hastalarda kantitatif HBsAg seviyelerinin HBV DNA ve ALT-AST seviyeleri ile karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Kasım 2015-Mayıs 2016 tarihleri arasında HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe ve HBV DNA düzeylerinin belirlenmesi için gönderilen 91 KHB'li hastaya ait serum örneği çalışmaya dâhil edildi. Bütün hastalar HCV, HIV ko-enfeksiyonu ve otoimmun veya metabolik karaciğer hastalığı yönünden negatifti.

Biyokimyasal ve serolojik analiz

Hastalarının karaciğer biyokimyasal profilleri, ALT ve AST enzim seviyelerinin (IU/L) ölçülmesi ile belirlendi. Hasta serumlarında HBV serolojik belirteçleri; HBsAg, anti-HBs, HBeAg ve anti-HBe varlığı ELISA yöntemi (Architect i2000SR, Abbott, Almanya) ile belirlendi. Kantitatif HBsAg ölçümü ELISA yöntemi (Architect i2000SR, Abbott, Almanya) ile 0.05-250 IU/mL limit aralığında gerçekleştirildi. Sonuç >250 IU/mL çıktığında 1:500 oranında sulandırma yapılarak tekrar çalışıldı.

HBV DNA seviyeleri

HBV DNA düzeyleri, gerçek zamanlı PCR yöntemi (Cobas TaqManTM 48, Roche, Almanya) ile araştırıldı. Testin analitik duyarlılığı 20 IU/mL ve dinamik aralığı 20-$1.7x10^8$ IU/mL'dir.

Hastalar, HBV DNA seviyesi <50 olan 29 olgu,

<2000 olan 21 olgu >2000 olan 41 olgu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Bu üç grup ALT-AST ve kantitatif HBsAg düzeyleri yönünden karşılaştırıldı.

İstatistiksel analiz

Bütün istatistik analizleri için SPSS (The Statistical Program for the Social Sciences, Ver. 17) kullanıldı. Çalışmada, kategorik veriler sayı ve yüzde cinsinden, sürekli değişkenler ise ortalama±standart sapma ve ortanca (min-maks) olarak özetlendi. Sürekli verilerin normal dağılıma uyum kontrolü Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Her değişken için gruplardan en az biri normal dağılıma uyumlu olmadığı için analizler non-parametrik yöntemlerle gerçekleştirildi. Sürekli değişkenler arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığı Spearman korelasyonu ile değerlendirildi. İki bağımsız grubun ölçüm parametreleri karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kategorik verilerin birbiri ile olan ilişkilerinin kontrol edilmesinde ise, χ^2 istatistiği kullanıldı. p değeri 0.05'ten küçük olduğunda, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hastaların yaş ortalaması 47.25±14.97 (13.00-78.00) yıl olup, 38'i kadın ve 53'ü erkekten oluşmaktadır. Örneklerin tamamı HBsAg pozitif olup 82'si HBeAg negatif ve 9'u HBeAg pozitif olarak belirlendi. Hastaların HBV DNA seviyesinin ortancası 1538.50 IU/Ml (19.00-64501284.00), kantitatif HBsAg değerinin ortancası 2210.06 IU/mL (0.05-46192.95) olup, ALT ve AST değerlerinin ortancası sırasıyla 20.80 IU/L (9.90-116.30) ve 23.00 IU/L (13.00-172.90) olarak belirlendi (Tablo 1).

Hastaların, HBsAg ölçüm değerleri ile HBV DNA düzeyleri arasındaki korelasyon istatistiksel anlamlı ($p<0.05$) ancak çok zayıf seviyede bir ilişkili bulundu ($r=0.276$).

HBV DNA düzeyi <2000 IU/mL olan hastalarda kantitatif HBsAg değerlerinin ortancası 1507.60 IU/mL (17.16-30894.66) ve ALT düzeyi 19.82 IU/L (10.7-29.9) olarak bulundu. HBV DNA düzeyi >2000 IU/mL hastalarda ise, kantitatif HBsAg değerlerinin ortancası 2984.21 IU/mL (0.05-46192.95) ve ALT düzeyinin ortancası ise 23.9 IU/L (9.9-116.3) olarak belirlendi. Sonuçlara göre HBV DNA düzeyi <2000 ve >2000 grupları arasında kantitatif HBsAg ve ALT değerleri bakımından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

ALT düzeyi normalden yüksek olan hastalarda HBV DNA ve kantitatif HBsAg düzeyleri ALT düzeyi normal olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu ($p<0.05$). AST düzeyi normalden yüksek olan hastalarda

Tablo 1. Hastalara ait cinsiyet, yaş, ALT-AST değeri, HBV DNA ve kantitatif HBsAg değerleri.

HBV DNA IU/ml	Sayı n	Cinsiyet n (%)	Yaş ortalama	ALT* (IU/L)	AST* (IU/L)	HBV-DNA* (IU/mL)	HBsAg* (IU/mL)
<50	29	19 E (65.5) 10 K (34.5)	51.48 (19-76±15.53)	23 (10.30-76.9)	23 (13-57)	20 (19-50)	1497,99 (0.05-16807.12)
<50-<2000	21	11 E (52.4) 10 K (47.6)	48.04 (24-72±13.61)	18.40 (10.7-40.5)	20 (18-38)	466 (139-1600)	1357.32 (17.16-30894.66)
>2000	41	23 E (56.1) 18 K (43.9)	43.85 (13-78±14.75)	21.28 (9.9-116.3)	23.00 (13-172.9)	9628 (2067-64501284)	3745.57 (102.93-46192.95)
Toplam	91	53 E (58.2) 38 K (41.8)	47.25 (13-78±14.97)	20.80 (9.90-116.30)	23 (13-172.90)	1538.50 (19-64501284)	2210.06 (0.05-46192.95)

**Ortanca (min-maks) değerleri verilmiştir.*

Tablo 2. ALT-AST düzeyleri normal ve normalden yüksek olan hastaların HBV DNA ve kantitatif HBsAg ölçüm değerleri.

ALT-AST (IU/L)	HBV-DNA (IU/mL)*	HBsAg (IU/mL)*
ALT <31	652 (19-8484960)	1451.28 (1.34-45796.59)
ALT>31	91960 (19-64501284)	6615.79 (0.05-46192.95)
p değeri	0.001	0.018
AST<32	623 (19-113017)	1457.91 (1.34-45796.59)
AST>32	204788 (19-64501284)	5747.17 (0.05-46192.95)
p değeri	0.001	0.233

**Ortanca (min-maks) değerleri verilmiştir.*

HBV DNA düzeyleri AST düzeyi normal olanlara göre yüksek olarak bulundu ($p<0.05$), ancak kantitatif HBsAg değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 2).

HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında, HBV DNA düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaz iken, HBeAg pozitif hastalarda kantitatif HBsAg düzeyleri, HBeAg negatif hastalardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3. HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasındaki HBV DNA ve kantitatif HBsAg değeri.

	Sayı	HBV-DNA (IU/mL)*	HBsAg (IU/mL)*
HBeAg (-)	82	717 (19-64501284)	1586.96 (0.05-46192.95)
HBeAg (+)	9	4147 (38-295985565)	6898.92 (3455.16-21008.76)
p değeri		0.089	0.004

**Ortanca (min-maks) değerleri verilmiştir.*

TARTIŞMA

Klinik pratikte HBsAg'nin kalitatif olarak tayini, HBV ile enfekte bireylerde tanısal belirteç olarak görev yapmaktadır[6]. Serum HBV DNA düzeyinin virus replikasyonunun en yaygın indikatörü olup, KHB enfeksiyonlu hastalarda hastalık aktivitesi ve hepatosellüler karsinoma riskinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak görev yapmaktadır. Antiviral tedaviye başlanması ve tedavi yanıtının izlenmesinde kantitatif HBsAg önemli bir viral faktör olarak belirtilmektedir[9]. Son zamanlarda HBsAg düzeyleri, KHB enfeksiyonunun prognoz veya tedavisinin izlenmesinde kullanılmaktadır[12]. Ancak belirlenebilir HBsAg seviyesine sahip olmayan HBV-DNA pozitif hastalarda, HBV enfeksiyonunun seyri ve tedavinin izlenmesi için, moleküler testlerin kullanımı ön plana çıkmıştır[6].

HBsAg seviyelerinin kronik hepatit B'nin farklı fazlarının değerlendirmesinde, özellikle HBeAg pozitif hastalarda immun tolerans ve immun temizlenmenin ayırt edilmesine yardımcı olabileceği ve HBeAg negatif hastalarda inaktif hastalık ve serumdan spontan HBsAg temizlenmesinin tahmin edilebileceği bildirilmektedir[8].

Bu çalışmada, KHB hastalarında, HBsAg ve HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı, ancak zayıf seviyede bir ilişkili bulundu ($p<0.05$, $r=0.276$). Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda da HBV enfeksiyonunun doğal seyrinin anlaşılmasında önemli bilgiler sağlayan benzer sonuçlar gösterilmiştir. HBsAg titresinin, immun tolerant, immun temizlenme, düşük replikatif faz ve HBeAg negatif hepatit gibi HBV enfeksiyonunun değişik fazlarında değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada, HBsAg titresinin her bir fazda farklı bulunduğu bildirilmiştir. HBsAg ve HBV DNA seviyesi tüm gruplarda anlamlı bir korelasyon gösterdiği, ancak HBsAg ile serum biyokimyasal değerlerinden ALT ve AST arasında herhangi bir korelasyon görülmediği bildirilmiştir[13]. Yine takipli KHB taşıyıcılarında beş yıl arayla gerçekleştirilen bir çalışmada, kantitatif HBsAg ve HBV DNA seviyelerinin anlamlı bir şekilde korelasyon gösterdiği bildirilmiştir[7].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da, KHB hastalarında HBsAg seviyelerinin HBV DNA ile korelasyon gösterdiği[14-16], kantitatif HBsAg ölçümün peg-interferon tedavisinin etkinliğini izlemede HBV DNA ile yer değişebileceği[14] ve

inaktif ve aktif taşıyıcıları ayırmada kullanılabileceği[16] bildirmiştir. KHB'li çocuk hastalarda yapılan bir çalışmada da, tedavi sırasında HBsAg, HBeAg, HBV DNA ve ALT seviyelerinin belirgin biçimde düştüğü ve kantitatif HBsAg testlerinin KHB tedavisinin takibinde oldukça önemli role sahip olduğu belirtilmiştir[17]. Başka bir çalışmada ise inaktif taşıyıcılarda kantitatif HBsAg seviyeleri ile HBV DNA arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı diğer yandan KHB'li hastalarda kantitatif HBsAg seviyesi ile HBV DNA arasında orta derecede ilişki bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca serum kantitatif HBsAg seviyesinin HBeAg negatif KHB ve inaktif taşıyıcıları ayırmada faydalı olabileceği bildirilmiştir[18].

Yaptığımız çalışmada, ALT düzeyi normalden yüksek olan hastalarda HBV DNA ve kantitatif HBsAg düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu ($p<0.05$). AST düzeyi normalden yüksek olan hastalarda HBV DNA düzeyleri yüksek olarak bulundu ($p<0.05$), ancak kantitatif HBsAg değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Balkan ve ark.[18] tarafından yapılan çalışmada ise, inaktif taşıyıcı ve KHB'li hastalarda, kantitatif HBsAg sevileri ile ALT arasında herhangi bir korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir.

Çalışmada, HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında, HBV DNA düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaz iken, HBeAg pozitif hastalarda kantitatif HBsAg düzeyleri, HBeAg negatif hastalardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Yapılan bir çalışmada, HBeAg pozitif KHB hasta grubunda, HBsAg ve HBV DNA düzeylerinin anlamlı bir şekilde pozitif korelasyon gösterdiği ve HBeAg negatif grupta çalışmamızda da olduğu gibi herhangi bir korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir[19]. KHB'li hastalarda gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, HBsAg ve HBV DNA titresinin HBeAg pozitif ve negatif hastalar arasında belirgin biçimde farklı bulunduğu, ancak HBsAg ve HBV DNA seviyeleri arasında herhangi bir korelasyonunun bulunmadığı bildirilmiştir[20]. Ülkemizde Sağlık ve ark.[15]'nın KHB'li hastalarda yaptıkları çalışmada ise, HBeAg pozitif hastalarda HBV DNA ve ALT düzeylerinin anlamlı derece yüksek bulunduğu bildirilmiştir. ALT düzeyi normalden yüksek olan hastalarda HBV DNA düzeylerinin ALT düzeyi normal olanlara göre yüksek bulunduğu ve yüksek ALT düzeyi ile HBsAg düzeyi arasında pozitif bir ilişki olmadığı belirtilmiştir. HBsAg ve HBV DNA arasındaki bu şekildeki uyumsuzlukların virusun yüksek spontan hata oranına sahip revers transkriptaz enziminin neden olduğu mutasyonlara ve antiviral tedavinin neden olduğu selektif baskı sonucu gelişen viral varyantlar ile endojen olarak konak immunitesine bağlı olarak gelişebileceği belirtilmiştir[21,22].

HBV'nin endemik olduğu bölgelerde kantitatif HBsAg testinin kullanılması, aktif HBV enfeksiyonunun belirlenmesi için ilk seçenek tarama aracı olarak, kalitatif HBsAg ve HBV DNA test kombinasyonundan daha ekonomik bir çözüm olabileceği belirtilmektedir[7]. Çalışmada kullanılan kantitatif HBsAg kitinin belirleme limit aralığı oldukça sınırlı olup, çalışılan örneklerin büyük çoğunluğu dinamik aralığın üstünde (>250 IU) HBsAg kansantrasyonuna sahip olduğu bulundu ve manuel ileri sulandırma yapılarak yeniden değerlendirildi. Bu nedenle, klinik pratikte örneklerin direkt önerilen koşullarda sulandırılarak çalışılması göz önünde bulundurulabilir.

Sonuç olarak, kantitatif HBsAg'nin ile HBV DNA düzeyi arasında belirlenen korelasyon nedeni ile kantitatif HBsAg ölçümü, KHB hastalarında HBV DNA'nın yanında replikasyonu izlemek için tamamlayıcı ek bir belirteç olabilir. Moleküler testlerin uygulanamadığı laboratuvarlarda, kantitatif HBsAg testlerinin kullanımı daha az maliyetli olduğu için KHB tedavi izlen-

mesinde daha uygun bir yaklaşım olabilir. Çalışma sonucunda, ALT düzeyi normalden yüksek olan hastalarda elde edilen yüksek HBV DNA ve kantitatif HBsAg düzeyleri nedeni ile kantitatif HBsAg ölçümünün KHB hastalarının izlenmesinde göz önünde bulundurulabileceği düşüncesindeyiz.

Teşekkür

Çalışmaya verilen bilimsel destekten ötürü Abbott laboratuvarlarına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Chang MS, Nguyen MH. Epidemiology of hepatitis B and the role of vaccination. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2017;31(3):239-47. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.05.008
2. Nannini P, Sokal EM. Hepatitis B: changing epidemiology and interventions. Arch Dis Child. 2017;102(7):676-80. https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-312043
3. Revill P, Locarnini S. Viral factors and predicting disease outcomes in chronic hepatitis B. Gut. 2015;64(2):191-3. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307398
4. Akhan S, Aynıoğlu A, Çağatay A ve ark. Kronik hepatit B virusu infeksiyonunun yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu Uzlaşı Raporu. Klimik Derg. 2014;27(Özel Sayı 1):S2-18.
5. Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. J Med Virol. 2014;86(6):925-32. https://doi.org/10.1002/jmv.23916
6. Liu YP, Yao CY. Rapid and quantitative detection of hepatitis B virus. World J Gastroenterol. 2015;21(42):11954-63. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i42.11954
7. Kuo YH, Chang KC, Wang JH, et al. Changing serum levels of quantitative hepatitis B surface antigen and hepatitis B virus DNA in hepatitis B virus surface antigen carriers: a follow-up study of an elderly cohort. Kaohsiung J Med Sci. 2015;31(2):102-7. https://doi.org/10.1016/j.kjms.2014.11.002
8. Cornberg M, Wong VW, Locarnini S, Brunetto M, Janssen HL, Chan HL. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. J Hepatol. 2017;66(2):398-411. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.009
9. Wong GLH, Chan HLY. Use of Quantitative hepatitis B surface antigen with hepatitis B virus DNA in clinical practice. Clinical Liver Disease. 2013;2(1):8-10. https://doi.org/10.1002/cld.165
10. Rijckborst V, Hansen BE, Cakaloglu Y, et al. Early on-treatment prediction of response to peginterferon alfa-2a for HBeAg-negative chronic hepatitis B using HBsAg and HBV DNA levels. Hepatology. 2010;52(2):454-61. https://doi.org/10.1002/hep.23722
11. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, Hansen BE, Janssen HL. Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. Hepatology. 2010;52(4):1251-7. https://doi.org/10.1002/hep.23844
12. Zeng DW, Zhu YY, Huang Q, et al. Hepatitis B surface antigen in late hepatitis B infection. J Med Virol. 2015;87(3):380-7. https://doi.org/10.1002/jmv.24078
13. Karra VK, Chowdhury SJ, Ruttala R, Polipalli SK, Kar P. Clinical significance of quantitative HBsAg titres and its correlation with HBV DNA levels in the natural history of hepatitis B virus infection. J Clin Exp Hepatol. 2016;6(3):209-15. https://doi.org/10.1016/j.jceh.2016.07.002
14. Ozaras R, Tabak F, Tahan V, et. al. Correlation of quantitative assay of HBsAg and HBV DNA levels during chronic HBV treatment. Dig Dis Sci. 2008;53(11):2995-8. https://doi.org/10.1007/s10620-008-0263-5
15. Sağlık İ, Mutlu D, Ongut G ve ark. Kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda HBsAg ve HBeAg değerlerinin HBV DNA ve alanin aminotransferaz düzeyleri ile karşılaştırılması. Viral Hepatit Derg. 2013;19(3):119-22. https://doi.org/10.4274/Vhd.84856
16. Günal Ö, Barut Ş, Etikan İ, Duygu F, Tuncel U, Sünbül M. Relation between serum quantitative HBsAg, ALT and HBV DNA levels in HBeAg negative chronic HBV infection. Turk J Gastroenterol. 2014;25(Suppl 1):S142-6. https://doi.org/10.5152/tjg.2014.5711
17. Demirören K, Kocamaz H, Doğan Y. The importance of the serum quantitative levels of hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen in children with chronic hepatitis B. Turk J Gastroenterol. 2015;26(1):36-41. https://doi.org/10.5152/tjg.2015.4636
18. Balkan A, Namiduru M, Balkan Y, Mete AO, Karaoglan I, Bosnak VK. Are serum quantitative hepatitis B surface antigen levels, liver histopathology and viral loads related in chronic hepatitis B-infected patients? Saudi J Gastroenterol. 2016;22(3):208-14. https://doi.org/10.4103/1319-3767.182454
19. Liu X, Chen JM, Lou JL, et al. Correlation between hepatitis B virus DNA levels and diagnostic tests for HBsAg, HBeAg, and PreS1-Ag in chronic hepatitis B. Genet Mol Res. 2016;15(2). (doi: 10.4238/gmr.15028282.) https://doi.org/10.4238/gmr.15028282
20. Ganji A, Esmaeilzadeh A, Ghafarzadegan K, Helalat H, Rafatpanah H, Mokhtarifar A. Correlation between HBsAg quantitative assay results and HBV DNA levels in chronic HBV. Hepat Mon. 2011;11(5):342-5.
21. Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. Antivir Ther. 2010;15(Suppl 3):S3-14. https://doi.org/10.3851/IMP1619
22. Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. Hepatology. 2012;56(2):434-43. https://doi.org/10.1002/hep.25592

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):66-71
doi:10.5222/TMCD.2018.066

Araştırma

Kan Kültürlerinden Soyutlanan Non Fermentatif Bakterilerin Dağılımlarının ve Antibiyotik Duyarlılık Oranlarının İncelenmesi[§]

Fatih ATEŞ, Nurullah ÇİFTÇİ, İnci TUNCER, Hatice TÜRK DAĞI
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

ÖZ

Amaç: *Non fermentatif gram negatif bakteriler ciddi nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, kan kültürlerinden izole edilen non fermentatif Gram negatif bakterilerin dağılımlarının ve antibiyotik duyarlılık oranlarının incelenmesidir.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmamızda, Ocak 2010-Aralık 2016 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen 134 Acinetobacter baumannii, 77 Pseudomonas aeruginosa, 9 Stenotrophomonas maltophilia ve 2 Burkholderia cepacia izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Saptanan bakterilerin tür tayini ve antibiyotik duyarlılık testi VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak yapılmıştır. Test sonuçları 2010-2015 tarihleri arasında CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute); 2016 tarihinde ise EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirilmiştir.*

Bulgular: *İzole edilen suşlarda antibiyotiklere en yüksek duyarlılık oranları A. baumannii için kolistin (%97.0), P. aeruginosa için kolistin (%97.4), gentamisin (%90.9) ve seftazidim için (%88.3) saptanmıştır. A. baumannii ve P. aeruginosa suşlarında kolistin en etkili antibiyotik olarak saptanmıştır.*

Sonuç: *Yüksek morbidite ve mortaliteye sahip bu enfeksiyonlarda bu tip çalışmaların her merkezde belirli aralıklarla yapılması ve kan kültürü laboratuvarlarının sonuçlarını hızlı bir şekilde ilgili kliniklere bildirmesi gerekmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter, antibiyotik duyarlılık, kan kültürü, nonfermentatifler, Pseudomonas*

ABSTRACT

Quantitative Determination of Antibiotic-Susceptibility Rates of Non-Fermentative Bacteria Isolated from Blood Cultures

Objective: *Non-fermentative gram- negative bacteria are detected as agents of serious nosocomial infections. The aim of this study is to determine the distribution of non-fermentative gram-negative bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibility rates.*

Material and Methods: *In our study, susceptibilities to various antibiotics of 134 Acinetobacter baumannii, 77 Pseudomonas aeruginosa, 9 Stenotrophomonas maltophilia and 2 Burkholderia cepacia strains, which were isolated from blood cultures between January 2010 and December 2016, were retrospectively evaluated. Identification and antimicrobial susceptibilities of the detected bacteria were carried out using the VITEK 2 (bioMérieux, France) automated system. Test results between 2010 and 2015 were evaluated according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) criteria. However in 2016, they were evaluated according to EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) criteria.*

Results: *The highest susceptibility rates of A. baumannii strains isolated were determined for colistin (97%). The highest susceptibility rates of P. aeruginosa strains were determined for colistin (97.4%), gentamicin (90.9%) and ceftazidime (88.3%) Colistin was determined as the most effective antibiotic against A. baumannii and P. aeruginosa strains.*

Conclusion: *For these infections with high morbidity and mortality, similar susceptibility studies should be performed at certain intervals at every center and the results of blood cultures should be reported to the clinics rapidly.*

Keywords: *Acinetobacter, antibiotic susceptibility, blood culture, nonfermentative, Pseudomonas*

Alındığı tarih: 21.08.2017
Kabul tarihi: 04.12.2017
Yazışma adresi: Nurullah Çiftçi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya
e-posta: ciftcinurullah72@gmail.com
[§] Bu çalışma 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri (01-03 Nisan 2016, İstanbul) tarihinde poster olarak (P-113) sunulmuştur.

GİRİŞ

Kan dolaşımı enfeksiyonları, tedaviye rağmen, önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olup, invaziv girişimlere paralel olarak sıklığı artmaktadır. Bu tür enfeksiyonların erken tanısı ve uygun tedavi edilmesi klinik açıdan önemlidir[1].

Non fermentatif gram negatif bakterilerden *Acinetobacter* türleri solunum yolu, üriner sistem ve yara enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojenlerdir, ayrıca septisemiye de neden olurlar. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, cerrahi enfeksiyon geçirmiş ve respiratuvar ventilasyon altındaki hastalar *Acinetobacter* enfeksiyonları için risk altındadır. *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisi, birçok antibiyotiğe yüksek direnç geliştirdiğinden oldukça zordur. *Pseudomonas* türleri çevresel ortamlarda yaygın olarak bulunabilmektedir. Hastane ortamında nemli bölgelerde, yiyeceklerde, lavabolarda, tuvaletlerde, yer temizlik bezlerinde, solunum cihazı ve diyaliz ekipmanlarında ve hatta dezenfektan solüsyonlarında bile bulunabilmektedir. *Pseudomonas* enfeksiyonları geniş spektrumlu antibiyotik kullanan ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda görülen primer fırsatçı enfeksiyonlardır. *Stenotrophomonas maltophilia*'nın neden olduğu en sık hastane kaynaklı enfeksiyonlar bakteriyemi ve pnömonidir. Organizma birçok antibiyotiğe dirençli olduğundan antimikrobiyal tedavisi zordur. *Burkholderia* türleri fırsatçı patojen olup, kateterli hastalarda septisemi, üriner sistem enfeksiyonları ve fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilir. Non fermentatif Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında in vitro duyarlılık test sonuçlarına göre özgül tedavi uygulanmalıdır[2].

Bakteriyemi olgularından izole edilen mikroorganizmaların dağılımları ve antibiyotik duyarlılıkları zamanla değiştiğinden dolayı, her merkezin hem ampirik tedavide yol gösterici olması hem de zamanla etken mikroorganizma türünün değişmesi ve antibiyotik dirençlerinde meydana gelen değişiklikleri göstermek amacıyla böyle çalışmaların yapılması önerilmektedir[3].

Bu çalışmada, çeşitli kliniklerden gönderilen kan kültür örneklerinden izole edilen non fermentatif gram negatif bakterilerin dağılımları ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının retrospektif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 1 Ocak 2010-31 Aralık 2016 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan kültürlerinden soyutlanan non fermentatif Gram negatif bakteriler retrospektif olarak incelendi. Bir hastadan aynı bakterinin ürediği durumlarda yalnızca biri çalışmaya dâhil edildi.

Kan kültürü örnekleri 2010-2013 yılları arasında BACTEC 9240 (Becton Dickinson, ABD), 2014-2016 yılları arasında ise BacT/ALERT 3D (bioMérieux, Fransa) otomatize kan kültür cihazlarında takip edildi. Üreme sinyali veren şişelerden Gram boyama yapıldı ve %5 koyun kanlı Columbia agar (bioMérieux, Fransa) ve Eozin Metilen Mavisi Agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine pasajlandı. Besiyerleri 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirildi. Bakteriler konvansiyonel yöntemler ve VITEK 2 (bio-Mérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak tanımlandı. Antibiyotik duyarlılık testleri ise VITEK 2 otomatize sistemi ile yapıldı ve sonuçlar 2010-2015 tarihleri arasında CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute); 2016 tarihinde ise EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirildi[4,5]. Saptanan *Burkholderia cepacia* ve *S. maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları CLSI'ya göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Kan kültürlerinden izole edilen toplam 222 non fermentatif Gram negatif bakterinin 134'ü *Acinetobacter baumannii*, 77'si *Pseudomonas aeruginosa*, dokuzu *S. maltophilia* ve ikisi *B. cepacia* olarak tanımlanmıştır.

Acinetobacter baumannii suşlarının kolistine %97 oranında duyarlı olduğu saptanmış, bunu tobramisinin (%50) takip ettiği görülmüştür. İmipenem için %15.7, siprofloksasin ve levofloksasin için %14.2 oranında duyarlılık belirlenmiştir.

Pseuodmonas aeruginosa suşlarında da en yüksek duyarlılık oranı kolistine (%97.4) karşı belirlenmiştir. Gentamisine %90.9, seftazidime %88.3, tobramisine %88.3 ve imipeneme %77.9 oranında duyarlılık olduğu görülmüştür. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarının diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

İzole edilen dokuz *S. maltophilia* suşunun hepsinin levofloksasin ve trimetoprim–sulfametoksazole duyarlı olduğu görülmüştür.

Saptanan iki *B. cepacia* suşunda meropenem ve trimetoprim–sulfametoksazol direnci saptanmış olup bir suşta seftazidime duyarlılık, diğer suşta ise sefepim, siprofloksasin ve levofloksasine duyarlılık saptanmıştır.

TARTIŞMA

Dolaşım sistemi enfeksiyonları yüksek mortalite ve morbiditeyle seyreden, erken tanı konulup tedavi edildiğinde mortalite oranlarının anlamlı olarak azaldığı klinik tablolardır[6]. Bu enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmaların dağılımı incelendiğinde zaman içerisinde değişiklikler saptanmaktadır. Bakteriyemik hastalarda, uzun yıllar Gram-negatif bakteriler daha sık izole edilirken, sonraki zamanlarda tanı ve tedavi amaçlı invazif girişimlerin artmasıyla birlikte, *Staphylococcus aureus*, koagülaz-negatif stafilokok (KNS)'lar ve enterokoklar gibi Gram-pozitif bakterilerin daha sık etken olduklarını görülmektedir[1].

Hastane ortamında özellikle de yoğun bakım ünitelerinde sık ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, çoklu ilaç direncine sahip *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarının ortaya çıkmasına ve bu etkenlere bağlı nozokomiyal enfeksiyonların sıklığında artışa neden olmaktadır[6]. Bu nedenle son yıllarda nefrotoksik etkilerinin olduğu bili-

Tablo 1. ***Acinetobacter baumannii*** **ve** ***Pseudomonas aeruginosa*** **suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.**

	Acinetobacter baumannii **n = 134**		***Pseudomonas aeruginosa*** **n = 77**	
Antibiyotikler	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
Kolitsin	130	97	75	97.4
Tobramisin	67	50	68	88.3
Amikasin	62	46.3	66	85.7
Netilmisin	61	45.5	62	80.5
Trimetoprim - sulfametoksazol	44	32.8	-	-
Gentamisin	35	26.1	70	90.9
İmipenem	21	15.7	60	77.9
Meropenem	20	14.9	62	80.5
Siprofloksasin	19	14.2	66	85.7
Levofloksasin	19	14.2	66	85.7
Ampisilin - sulbaktam	19	14.2	-	-
Piperasilin - tazobaktam	17	13.4	49	63.6
Sefepim	17	12.7	66	85.7
Seftazidim	14	10.4	68	88.3

nen kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* enfeksiyonlarında kolistin tedavisi yeniden tedavide kullanılmaya başlanmıştır[7].

Çalışmamızda, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında kolistin duyarlılık oranlarının sırasıyla %97 ve %97.4 olduğu görülmüştür. Yurt içinde yapılmış çeşitli çalışmalarda, *A. baumannii* suşlarında kolistin duyarlılığının %94-100 oranlarında saptandığı, *P. aeruginosa* suşlarında ise bu oranın %98-100 olduğu görülmüştür[3,8-14]. Yurt dışında yapılan çeşitli çalışmalarda, *A. baumannii* suşlarında kolistin direncinin İspanya'da %40.7, Kore'de %30.6 ve Amerika Birleşik Devletleri'nde %2.1 olduğu görülmüştür[15-17]. *P. aeruginosa* suşlarında ise Walkty ve ark.'nın[18] Kanada'da yaptıkları bir çalışmada, 2015 yılında %97.8 oranında kolistin duyarlılığı saptamışlardır.

Çalışmamızda, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında %97 ve %97.4 duyarlılıkla kolistin in vitro en etkili antimikrobiyal ajan olarak saptanmıştır. Fakat otomatize sistemler ile saptanan kolistin duyarlılık oranlarında güvenilirlik açısından bir tartışma olduğundan sonuçlar mikrodilüsyon yöntemi ile de doğrulanmalıdır.

Karbapenemler bakteriyel dirence karşı geliştirilmiş en etkili antibiyotiklerdendir fakat *S. maltophillia* gibi bakterilerde karbapenemlere doğal direnç bulunmaktadır. Son dönemlerde *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatlarında da karbapenamaz üretimindeki artış nedeniyle bu antibiyotiklere karşı direnç artışından endişe edilmektedir[19-22]. Atasoy ve ark.[23] yaptıkları çalışmada, kan kültürlerinden izole ettikleri *Acinetobacter* suşlarında %90.6 meropenem ve imipeneme direnç saptamışlarken, Yolbaş ve ark.[24] yaptıkları çalışmada, çeşitli kültürlerden izole ettikleri *Acinetobacter* suşlarında meropeneme %87 direnç saptamışlardır. Çalışmamızda, *Acinetobacter* suşlarında meropeneme %14.9, imipeneme %15.7 oranında duyarlılık saptanmış olup, yapılan diğer çalışmalar ile uyumludur. İzole ettiğimiz *Pseudomonas* suşlarında ise meropeneme %80.5 ve imipeneme %77.9 oranında duyarlılık saptanmıştır. Coşar ve ark.[25] yaptıkları çalışmada, imipeneme %28.5 direnç saptamışken, Demirbakan ve ark.[26] imipeneme %35, meropeneme %34 direnç saptamışlardır. Çelik ve ark.[12] çalışmalarında, imipenem ve meropeneme %20.3 direnç saptamışlardır.

Pseudomonas enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan siprofloksasine çalışmamızda, %85.7 duyarlılık saptanmıştır. Fakat *Acinetobacter* suşlarında siprofloksasine %14.2 duyarlılık olduğu görülmüştür. Temiz H ve ark.[27] yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında siprofloksasine sırasıyla %69.2 ve %42.9 duyarlılık olduğu görülmüştür. Çelik ve ark.[12] çalışmalarında, *P. aeruginosa* suşlarında siprofloksasine %87.5 duyarlılık olduğu görülmüştür. Çetin ve ark.[28] yaptıkları diğer bir çalışmada da, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında sırasıyla %91.9 ve %8.9 oranlarında duyarlılık belirtmişlerdir. Çalışmamızda, saptadığımız *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarındaki siprofloksasin duyarlılık oranlarına göre *Pseudomonas* enfeksiyonlarında kinolonların etkili olduğu fakat *Acinetobacter* enfeksiyonlarında yüksek direnç oranlarından dolayı kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, sefepim ve seftazidime *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında sırasıyla %12.7 ve %10.4 ile %85.7 ve %88.3 oranlarında duyarlılık olduğu görülmüştür. Literatürde yapılmış çeşitli çalışmalarda, sefepime *A. baumannii* izolatlarında %5-40 oranlarında, *P. aeruginosa* suşlarında ise %60-80 oranlarında duyarlılık olduğu görülmüştür[12,14,27,29]. Seftazidime ise *A. baumannii* suşlarında %11-22, *P. aeruginosa* suşlarında %70-85 oranlarında duyarlılık olduğu görülmüştür[12,14,27,29]. Bu sonuçlara göre *Pseudomonas* enfeksiyonlarında

sefepim ve seftazidim etkinliğinin yüksek olduğu fakat *Acinetobacter* enfeksiyonlarında düşük etkinliğe sahip olduğu söylenebilir.

Aminoglikozidler *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi birçok Gram-negatif basilin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında sırasıyla tobramisine %50 ve %88.3, amikasine %46.3 ve %85.7, gentamisine %26.1 ve %90.9 oranlarında duyarlılık saptandığı görülmüştür. Çeşitli çalışmalarda, *Acinetobacter* suşlarında tobramisine %13-51, amikasine %31-68, gentamisine %18-72 oranlarında duyarlılık olduğu görülmüştür[3,14,19-21,27,30]. *Pseudomonas* suşlarında ise tobramisine %70-89, amikasine %62-88, gentamisine %66-77 oranlarında duyarlılık olduğu görülmüştür[15,27,30-32]. Bu sonuçlara göre, *Acinetobacter* suşlarında aminoglikozitlerin etkinliğinin düşmekte olduğu, fakat *Pseudomonas* suşlarında aminoglikozitlerin yüksek etkinliklerinin bulunduğu ve tedavide göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülebilir.

Stenotrophomonas maltophilia son yıllarda hastane enfeksiyonlarında önemi giderek artan bir mikroorganizmadır[33]. Çalışmamızda, izole ettiğimiz dokuz *S. maltophilia* suşunun hepsinde yalnızca levofloksasin ve trimetoprim-sulfametoksazol için duyarlılık saptanmıştır. Antalya'da yapılan bir çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. maltophilia* suşlarının tamamı trimetoprim-sulfametoksazole duyarlı bulunmuştur[34]. Kurt Azap ve ark.[35] tarafından yapılan bir çalışmada, *S. maltophilia* suşlarında levofloksasine %81 duyarlılık olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda, *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarında kolistin en etkili antibiyotik olarak saptanmışken; *Pseudomonas* suşlarında da aminoglikozitlere, karbapenemlere ve sefalosporinlere yüksek duyarlılık saptanmıştır. Dirençli non fermentatif Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisi zor, pahalı ve zaman alıcıdır. Bu etkenlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre tedavinin yönlendirilmesi gerekmekte ve çabuk direnç gelişimi nedeniyle tedavi sırasında kültür ve antibiyotik duyarlılık testinin tekrarlanması önerilmektedir. Antibiyotik duyarlılığının hastaneler arasında farklı olabileceği dikkate alınmalı ve direnç gelişimi sürekli takip edilmelidir. Her hastanenin yıllar içerisindeki antimikrobiyal direnç oranlarındaki farklılıkların belirlenmesi, hem enfeksiyon kontrolü hemde ampirik tedavi politikalarının belirlenmesi açısından güncelleme sağlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Öncül O. Hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008:575-604.
2. Çıragil P. Pseudomonas ve ilişkili bakteriler. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds) Tıbbi Mikrobiyoloji, 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık; 2010:333-41.
3. Uzun B, Güngör S, Yurtsever SG, Afşar İ, Demirci M. Yoğun bakım hastalarının kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. ANKEM Derg. 2012;26(2):55-60. https://doi.org/10.5222/ankem.2012.055
4. CLSI. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, CLSI Document M100-S21, Wayne: ABD; 2011.
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1, valid from 2017-03-10 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf
6. Gültekin E, Uyanık MH, Hancı H, Erdil Z, Gelen FN, Çelebi S. Kan kültürlerinden izole edilen nonfermentatif Gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2014;28(3):79-85.
7. Tasbakan MS, Pullukcu H, Korkmaz Ekren P, et al. Panrezistan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* ile gelişen ventilatörle ilişkili pnömonilerde kolistin kullanımı. Mikrobiyol Bul. 2009;43(1):61-70.
8. Demirtürk N, Demirdal T. Antibiyotiklerde direnç sorunu. Kocatepe Tıp Derg. 2004;5(1):17-21.
9. Akalın H. Kolistin. ANKEM Derg. 2007;21(Ek 2):E26-8.
10. Gündoğdu A, Kılıç H, Ulu Kılıç A, Aydın Günsu, Alp E. Pediyatrik hastalarda nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerinin

incelenmesi. Klimik Derg. 2016;29(1):29-35.
11. Kurtoğlu MG, Opuş A, Kaya M, Keşli R, Güzelant A, Yüksekkaya Ş. Bir eğitim ve araştırma hastanesinde klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibakteriyel direnç (2008-2010). ANKEM Derg 2011;25(1):35-41.
12. Çelik C, Gözel MG, Uysal EB, Bakıcı MZ, Gültürk E. Kan akımı enfeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnç paterni: altı yıllık değerlendirme. Klimik Derg. 2013;26(3):108-12.
13. Keskin H, Tekeli A, Dolapçı İ, Öcal D. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında beta-laktamaz kaynaklı direncin moleküler karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul. 2014;48(3):365-76. https://doi.org/10.5578/mb.7796
14. Özdemir M, Erayman İ, Gündem NS, Baykan M, Baysal B. Hastane enfeksiyonu etkeni *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. ANKEM Derg. 2009;23(3):127-32.
15. Arroyo LA, Mateos I, González V, Aznar J. In vitro activities of tigecycline, minocycline, and colistin-tigecycline combination against multi- and pandrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* group. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(3):1295-6. https://doi.org/10.1128/AAC.01097-08
16. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1607-15. https://doi.org/10.1093/jac/dks084
17. Ahmed SH, Fekry Abdelwahab S, Hasanen AM, Mohammed DS. Multidrug resistant Egyptian isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Am Sci. 2011;7(1):1013-9.
18. Walkty A, Wiens PL, Adam H, et al. Antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008-2015. Diagn Microb Infect Dis. 2017;87(1):60-3. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.003
19. Büyük A, Yılmaz FF, Yurtsever SG, Limoncu MH. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç profili ve genotipleri ile tigesiklin ve kolistinin çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonlarının in vitro etkileşimleri. Turk J Pharm Sci. 2017;14(1):13-8. https://doi.org/10.4274/tjps.44127
20. Özdem B, Gürelik FÇ, Çelikbilek N, Balıkçı H, Açıkgöz ZC. Çeşitli klinik örneklerden 2007-2010 yıllarında izole edilen *Acinetobacter* türlerinin antibiyotik direnç profilleri. Mikrobiyol Bul. 2011;45(3):526-34.
21. Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi. ANKEM Derg. 2012;26(2):80-5. https://doi.org/10.5222/ankem.2012.080
22. Mansur A, Kuzucu Ç, Ersoy Y, Yetkin F. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde 2008 yılında yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2009;23:177-81.
23. Atasoy AR, Karakeçe E, Terzi HA, Çiftci İH. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antimikrobiyal direnç. J Surg Arts. 2014;7(1):7-10.
24. Yolbaş İ, Tekin R, Güneş A, et al. Bir üniversite hastanesindeki *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. J Clin Exp Invest. 2013;4(3):318-21. https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2013.03.0292
25. Coşar M, Tuncer İ, Arslan U. Kan kültürlerinde üreyen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profili. Infeks Derg. 2009;23(2):47-50.
26. Demirbakan H, Dağlar D, Yıldırım Ç, et al. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2005;35(3):183-8.
27. Temiz H, Temiz S, Kaya Ş, Çelen MK. Kan kültürlerinden izole edilen gram - negatif bakterilerde çeşitli antibiyotiklere direnç. Klimik Derg. 2014;27(2):62-8. https://doi.org/10.5152/kd.2014.15
28. Çetin ES, Kaya S, Pakbaş İ, Demirci M. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. Inönü Unv Tıp Fak Derg. 2007;14(2):69-73.
29. Bilman FB, Ayaydın Z, Turhanoğlu M, Onur A, Aktar GS. Bir eğitim ve araştırma hastanesinde yoğun bakımlardan izole edilen nonfermentatif gram-negatif mikroorganizmaların direnç profilleri. J Clin Exp Invest. 2014;5(3):391-6.
30. Ece G. Kan kültüründe üreyen izolatların dağılım ve antibiyotik duyarlılık profilinin incelenmesi. Med Bull Haseki. 2013;51(4):151-6. https://doi.org/10.4274/Haseki.1044
31. Tümer S, Kirişçi Ö, Özkaya E, Çalışkan A. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2015;29(3):99-104.
32. Köse Ş, Atalay S, Ödemiş İ, Adar P. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2014;28(3):100-4.
33. Öztürk R. Çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia* ile oluşan enfeksiyon hastalıklarında antimikrobik tedavi. ANKEM Derg. 2008;22(Ek 2):E36-43.
34. Öngüt G, Özcan A, Kandişer A, Öğünç D, Çolak D, Gültekin M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının E test ile araştırılması. Infeks Derg. 2005;19(4):425-8.
35. Kurt Azap Ö, Timurkaynak F, Arslan H, Özbalıkçı Karaman S. Hastane enfeksiyon etkeni olarak izole edilen non-fermentatif Gram negatif bakterilerde siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasinin in-vitro etkinliğinin karşılaştırılması. Ankara Unv Tıp Fak Mec. 2004;57(4):189-94.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):72-77
doi:10.5222/TMCD.2018.072

Araştırma

Sifiliz Tanısında Kullanılan RPR, TPHA Test Sonuçlarının ve Tanı Algoritmalarının Değerlendirilmesi

Cemile SÖNMEZ
Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı, Ankara

ÖZ

Amaç: *Ülkemizde, sifiliz bildirimi zorunlu bir hastalık olmasına rağmen, bildirim sistemindeki sorunlar nedeniyle hastalığın gerçek sıklığını tahmin etmek güçtür. Bu çalışmada, RPR veya hızlı test sonuçları pozitif olarak saptanan ve merkezimize doğrulama amacıyla gönderilen serum örnekleri RPR ve TPHA testleri kullanılarak yeniden çalışılmıştır. Sifiliz tanısında kullanılan konvansiyonel ve ters algoritmaların, elde edilen veriler doğrultusunda değerlendirilmesi de amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Ocak 2014 - Kasım 2017 tarihleri arasında RPR veya hızlı test sonuçları pozitif olan ve doğrulama amacıyla merkezimize gönderilen 362 hastaya ait serum örneklerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Konvansiyonel ve ters algoritmalar retrospektif olarak incelendi. İstatistiksel analiz için SPSS versiyon 23.0 paket programı kullanıldı.*

Bulgular: *Sifiliz şüpheli 362 hastanın 147 (%40.6)'sinde RPR testi negatif, TPHA testi pozitif; 6 (%1.7)'sında RPR testi pozitif TPHA testi negatif olarak saptanmıştır. Yüz yetmiş üç (%47.8) hastanın hem RPR hem de TPHA testi pozitif bulunmuştur. Hem RPR hem de TPHA pozitifliği olanların yıllara göre dağılımı incelendiğinde en fazla pozitiflik (%59.45) 2017 yılında gözlenmiştir. Konvansiyonel algoritmada 173 hasta pozitif, 6 hasta yalancı pozitif olarak belirlenmiştir. Ters algoritmada ise 311 hasta pozitif 9 hasta yalancı pozitif olarak saptanmıştır.*

Sonuç: *Çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, sifiliz pozitif olgu sayılarında en fazla 2017 yılında artış olduğu belirlenmiştir. Şüpheli olguların tanısında, ters algoritmanın sifiliz tanı kapasitesinin artırılmasına katkı sağlayacağı düşüncesine varılmıştır.*

Anahtar kelimeler: *Treponema pallidum, sifiliz, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, algoritmalar*

ABSTRACT

Evaluation of RPR, TPHA Test Results and Diagnostic Algorithms Used in Syphilis Diagnosis

Objective: *Despite the fact that syphilis reporting is mandatory in our country, it is difficult to predict the actual frequency of the disease due to the problems in the notification system. RPR or rapid test positive sera sent to our center for confirmation, were tested by RPR and TPHA tests again. In this study it is aimed to evaluate the conventional and reverse algorithms used in syphilis diagnosis in terms of obtained data.*

Material and Methods: *The results of serum samples from 362 patients who had positive RPR or rapid test results and were sent to our center for confirmation between January 2014-November 2017 were re-evaluated. Conventional and reverse algorithms were analyzed retrospectively. SPSS version 23.0 package program was used for statistical analysis.*

Results: *Out of 362 suspected syphilis patients 147 (40.6%) RPR negative and TPHA positive; 6 (1.7%) RPR positive and TPHA negative. 173 (47.8%) RPR and TPHA positive patients were detected. When the distribution of both RPR and TPHA positivities was determined according to the years, the highest positivity was observed in the year 2017. In the conventional algorithm, 173 patients were positive and six were false positive. In the reverse algorithm, 311 patients were positive and nine were false positive.*

Conclusion: *As a result, it was determined that the number of syphilis positive cases mostly increased in the year 2017. In the case of suspicious patients, it is concluded that the reverse algorithm will contribute to the increase in the diagnostic capacity of syphilis.*

Keywords: *Treponema pallidum, syphilis, sexually transmitted diseases, algorithms*

GİRİŞ

Sifiliz, *Treponema pallidum'*un neden olduğu bir hastalıktır[1]. Başlıca cinsel yol olmak üzere transplasental olarak ve kan nakli ile bulaşabilmektedir[2,3]. Ülkemizde, bildirimi zorunlu bir hastalık olmasına rağmen, bildirim sistemindeki sorunlar nedeniyle hastalığın gerçek sıklığını tah-

Alındığı tarih: 10.12.2017
Kabul tarihi: 04.02.2018
Yazışma adresi: Cemile Sönmez, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı, Ankara
e-posta: cemilesonmez2004@yahoo.com

min etmek güçtür. Gelişmiş ülkelerde özellikle HIV pozitif bireylerde insidansın artış gösterdiği belirtilmektedir[1,4]. Kültürde üretilememesi nedeniyle tanıda başlıca serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Nontreponemal testler; VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) ve RPR (Rapid Plasma Reagin), kardiolipin, lesitin ve kolesterol antijenlerine karşı oluşmuş özgül olmayan antikorları saptayan flokülasyon temelli testlerdir[5]. *T. pallidum* antijenlerine karşı oluşmuş özgül antikorları saptayan TPHA (*T. pallidum* Hemagglutination Assay), TPPA (*T. pallidum* Particle Agglutination Assay), FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption) ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testleri ise treponemal testler olarak kullanılmaktadır[6,7]. Günümüzde sifiliz tanısında farklı algoritmalar kullanılmaktadır. Bunlardan konvansiyonel algoritmada nontreponemal testler tarama amaçlı kullanılır ve pozitif sonuçların treponemal testlerle doğrulanması gerekir[8]. Ters algoritma olarak tanımlanan diğer bir algoritma, "European Center for Disease Prevention and Control" (ECDC) algoritmasında ise tarama amacıyla treponemal testler kullanılır ve pozitif sonuçlar farklı bir treponemal test ile doğrulanır[6]. Treponemal testler özgüllüğü yüksek olan ve konvansiyonel algoritmada doğrulama amaçlı, ters algoritmada ise hem tarama hem de doğrulama amaçlı kullanılan testlerdir. Nontreponemal testler tedavi takibinde kullanılabilmekle birlikte, treponemal testler hayat boyu pozitif olarak kalabilecekleri için tedavi takibinde kullanılmazlar[6,9]. Treponemal testlerde, nontreponemal testlere kıyasla yalancı pozitiflik oranı daha düşüktür. Pozitif nontreponemal test sonuçlarının, treponemal testlerle doğrulanması gerekmektedir. Treponemal testlerden saptanan yalancı pozitiflikler; teknik sorunlar, damar içi ilaç kullanımı, gebelik, patojen olmayan *Treponema*'lar, çapraz reaksiyonlara neden olabilen *Borrelia* cinsleri ve farklı otoimmün hastalıklardan kaynaklanabilmektedir. Treponemal testlerde yalancı negatif sonuçlara sık rastlanmamaktadır[10]. Merkezimize tüm illerden doğrulama amacıyla serum örnekleri gönderilmektedir. Hastalara ait istem formları incelendiğinde, laboratuvarlarda sifiliz taraması amacıyla genellikle RPR testinin kullanıldığı görülmektedir. Günümüzde sifiliz tanısı için kullanılacak algoritmalar tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Özbek ve ark.[11] tarafından yapılan bir çalışmada, önerildiği gibi her merkezin algoritmalar içerisinde kendine uygun olan algoritmayı kullanması sifiliz laboratuvar tanısının iyileştirilmesi için uygun olacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, RPR veya hızlı test sonuçları pozitif olarak saptanan ve merkezimize doğrulama amacıyla gönderilen serum örnekleri RPR ve TPHA testleri kullanılarak yeniden çalışılmıştır. Sifiliz tanısında kullanılan konvansiyonel ve ters algoritmalar kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2014 - Kasım 2017 tarihleri arasında RPR veya hızlı test sonuçları pozitif olarak saptanan ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Referans Laboratuvarı'na doğrulama amacıyla gönderilen 362 hastaya ait serum örneklerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Tüm hasta örneklerinde nontreponemal test olarak RPR (Plasmatec, İngiltere), treponemal test olarak TPHA (Plasmatec, İngiltere) testleri çalışıldı. TPHA testi pozitif olarak değerlendirilen örnekler FTA-abs (Euroimmun, Almanya) testi ile doğrulandı. RPR testi pozitif saptanan örnekler titre edildi. TPHA testinde 1/80 ve üzerindeki titreler pozitif olarak değerlendirilirken, FTA-abs test sonuçları kalitatif olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda, konvansiyonel ve ters algoritmalar, laboratuvar verilerinin retrospektif olarak incelenmesi ile değerlendirildi. Konvansiyonel

algoritmada temel olarak RPR testi tarama amaçlı kullanılmakta ve pozitif sonuçlar TPHA testi ile doğrulanmaktadır. Çalışmamızda, RPR ve TPHA testleri pozitif olarak belirlenen olgular akut veya geçirilmiş sifiliz enfeksiyonu şeklinde değerlendirildi. Ters algoritmada[7] ilk aşamada treponemal TPHA testi ile tarama yapılmakta ve pozitif olarak belirlenen örnekler, farklı bir treponemal test, FTA-abs testi ile doğrulanmaktadır. Hem TPHA hem de FTA-abs sonucu pozitif olarak saptanan örnekler geçirilmiş sifiliz enfeksiyonu yönünde değerlendirildi. Nontreponemal testin pozitif, treponemal testin negatif olarak saptandığı hastalar yalancı pozitif, nontreponemal testin negatif ve treponemal testin pozitif olarak saptandığı hastalar ise geçirilmiş sifiliz enfeksiyonu veya geç/latent sifiliz olarak değerlendirildi[7]. İstatistiksel analiz için SPSS versiyon 23.0 paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı analizler; ortalama, sayı ve yüzde dağılımları hesaplandı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

RPR ve hızlı test sonuçları pozitif olarak saptanan ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Referans Laboratuvarı'na sifiliz şüphesi ile başvuran 362 olgunun 255'i (%70.4) kadın, 107'si (%29.6) erkektir. Çalışmada yer alan hastalar 0-82 yaş arasında olup, yaş ortalamaları 45 olarak bulunmuştur. RPR testi negatif, TPHA testi pozitif 147 (%40.6) hastaya ait istem formları incelendiğinde hastaların önceden sifiliz enfeksiyonu geçirdikleri ve tedavi aldıkları belirlenmiştir. Başvuru yapan hastaların 173'ünde (%47.8) RPR ve TPHA pozitifliği saptanmıştır. Bu hastalarda RPR titresinin 1/16 ve üzerinde olduğu belirlenmiştir. RPR ve TPHA testleri pozitif bulunan 173 hasta yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde, en fazla pozitifliğin 20-30 (%25) yaş aralığında olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre söz konusu yaş grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). RPR ve TPHA pozitifliğinin 2014-2017 yıllarına göre dağılımı değerlendirildiğinde, hem RPR hem de TPHA test pozitifliğinin en fazla 2017 yılında (%59.45) olduğu gözlenmiştir (Tablo 1).

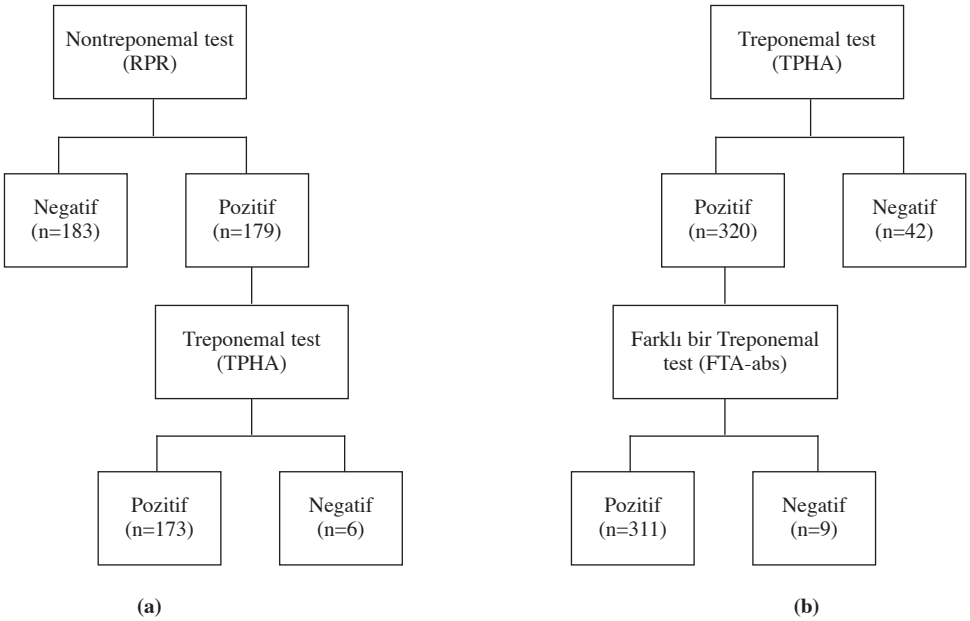
Toplam 362 serum örneğine ait sonuçlar konvansiyonel [Şekil 1(a)] ve ters [Şekil 1(b)] algoritmalar ile değerlendirildiği zaman, konvansiyonel algoritmada 173 hasta pozitif olarak değerlendirilirken, 6 (%3.35) hastanın yalancı pozitif olarak saptandığı görülmektedir. Ters algoritmada ise 311 hasta pozitif olarak değerlendirilirken, 9 (%2.81) hasta yalancı pozitif olarak saptanmıştır. Ters algoritma ile belirlenen 9 hastaya ait istem formları incelendiğinde hepsinin gebe oldukları belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri ve birçok ülkede sifiliz enfeksiyon sıklığında artış rapor edilmektedir[12]. Ülkemizde

Tablo 1. Sifiliz şüphesi ile başvuran hastaların RPR ve TPHA sonuçlarının 2014-2017 yıllarına göre dağılımı.

	RPR (+) TPHA (-)		RPR (+) TPHA (+)		RPR (-) TPHA (-)		RPR (-) TPHA (+)	
Yıl Sayı (n)	n	%	n	%	n	%	n	%
2017 (n=74)	0	0	44	59.45	4	5.40	26	35.15
2016 (n=70)	3	4.2	40	57.14	6	8.57	21	30
2015 (n=136)	3	2.20	58	42.64	8	5.88	67	49.26
2014 (n=82)	0	0	31	37.80	18	21.95	33	40.2
Toplam (N=362)	6	1.7	173	47.8	36	9.9	147	40.6



(a) Konvansiyonel Algoritma **(b) Ters Algoritma**

Şekil 1. Sifiliz serolojik tanısında kullanılan farklı algoritmalar ve test sonuçlarının algoritmalar içindeki dağılımı.

bildirim sistemindeki sorunlar nedeniyle sifiliz sıklığı hakkında kısıtlı veri bulunmaktadır. Adışen ve ark.'nın[13] çalışmasında, sifiliz olgu sayılarının 1994 ile 2006 yılında %0.027 olgudan %0.004 olguya düştüğü rapor edilmektedir. Çalışmamızda 2014-2017 yıllarına ait RPR ve TPHA testlerinin 4 yıllık retrospektif incelenmesinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, sifiliz pozitif olgu sayılarında en fazla 2017 yılında artış olduğu dikkati çekmektedir. Ülkemizde seks işçilerinde yapılmış bir tez çalışmasında RPR ve TPHA test pozitifliğinin %7 oranında olduğu saptanmıştır[2]. Çalışmamızda, 362 sifiliz şüpheli olgunun 173'ünde (%47.8) RPR ve TPHA testi pozitif olarak saptanmıştır. Oranlar arasındaki farkın her iki çalışmadaki örnek seçiminden kaynaklandığı düşünülmüştür. Tez çalışmasında, özellikli bir grupta sifiliz taraması yapılırken, çalışmamızda tarama basamağında pozitiflik saptanmış ve doğrulama için merkezimize gönderilmiş hasta örnekleri çalışılmıştır. RPR testi titre edilerek çalışıldığında bu hastaların 1/16 ve üzerinde titreye sahip oldukları belirlenmiştir. Konvansiyonel yöntem ile RPR ve TPHA testi pozitif olan 173 (%47.8) hastaya akut sifiliz tanısı ile uyumlu sonuç verilmiştir. Sifiliz şüpheli 362 olgunun 147 (%40.6)'sinde ise RPR testi negatif, TPHA testi pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu hastalara ait istem formları incelendiğinde, önceden sifiliz enfeksiyonu geçirdikleri ve tedavi aldıkları belirlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmamızda konvansiyonel algoritma ile RPR pozitif olup, TPHA negatif olarak değerlendirilen 6 (%1.7) hastaya ait sonuçlar yalancı pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçların daha fazla otoimmün hastalarda, gebelerde, ilaç bağımlılarında görülebileceği rapor edilmektedir[14]. Konvansiyonel algoritma ABD ve bazı Avrupa ülkelerinde kullanılmaktadır[15]. Prevalansın yüksek olduğu toplumlarda daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Ayrıca bu algoritma ile enfeksiyonun aktivitesi de belirlenebilmektedir[16]. Konvansiyonel algoritmada duyarlılık ve özgüllük düşük olup, yalancı pozitiflikler yüksek olarak belirlendiği için sonuçların doğrulanması gerekir[17].

Son yıllarda sifiliz serolojik tanısı için en fazla yeğlenen yaklaşımlardan olan ters algoritmada konvansiyonel algoritmadan farklı olarak tarama testi olarak treponemal testler kullanılmaktadır[16]. Pozitif olarak saptanan sonuçlar ikinci ve farklı bir treponemal test ile doğrulanmaktadır. Ters algoritma ile ilgili verilerimiz incelendiğinde, 311 olgunun hem TPHA hem de FTA-abs testlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. Konvansiyonel algoritmaya göre daha fazla pozitifliğin saptanmış olması yalancı pozitifliklere bağlı olabileceği gibi, Binnicker ve ark.'nın[16] da rapor ettiği gibi geçirilmiş veya son zamanlarda tedavi almış hastalarda ve ayrıca hastalığın geç/latent dönemlerinde de görülebileceği düşünülmüştür. Bulgularımızla benzer olarak farklı çalışmalarda da belirtildiği gibi, tarama amacıyla nontreponemal testlerin yerine treponemal testlerin kullanılmasının pozitifliklerde artışa neden olduğu görülmüştür[18-20]. Çalışmamızda, konvansiyonel algoritma ile %3.35, ters algoritma ile %2.81 yalancı pozitiflik belirlenmiştir. Bu oranlar her iki algoritmada da yalancı pozitifliklerin olabildiğini göstermektedir. Ters algoritmadan elde edilen yalancı pozitifliklerin saptandığı hastalara ait istem formları incelendiğinde, 9 olgunun hepsinin gebe oldukları belirlenmiştir. Gebe hastalarda yalancı pozitifliklerin görülebileceği literatür bilgileri ile de desteklenmektedir[14]. Ters algoritma günümüzde birçok Avrupa ülkesinde kullanılmaktadır[15]. Örnek sayısı fazla olan laboratuvarlarda maliyet etkin bir yaklaşım olup, sifiliz prevalansı düşük olan toplumlarda daha güvenilir sonuçlar vermektedir[21].

Çalışmamızda, ters algoritmanın konvansiyonel algoritmaya göre daha az yalancı pozitifliklere neden olması ve ayrıca literatürden elde edilen verilere göre erken ve geç dönem olguları daha iyi belirleyebileceği de göz önünde bulundurulduğu zaman laboratuvarlarda sifiliz tanısı için tercih nedeni olabileceği düşünülmüştür[6,7]. Bu yaklaşımda hastalığın aktivitesini belirleyebilmek için nontreponemal testlere gereksinim duyulmaktadır[22]. Tedavi alan ve hastalığı geçiren kişilerde treponemal antikorlar ömür boyu pozitif olarak kalacağı için geçirilmiş enfeksiyonlar ters algoritmada pozitiflik olarak saptanacaktır. Bu nedenle testlerin değerlendirilmesinde, hastanın tıbbi öyküsü ve risk değerlendirmesi, daha önce tedavi alıp almadığına ilişkin tıbbi öykü önemlidir. Çalışmamızdaki en önemli kısıtlamalardan biri hastalara ait yeterli klinik bilginin bulunmamasıdır.

Sonuç olarak, çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde sifiliz pozitif olgu sayılarında en fazla 2017 yılında artış olduğu belirlenmiştir. Şüpheli olguların tanısında, ters algoritmanın sifiliz tanı kapasitesinin artırılmasına katkı sağlayacağı düşüncesine varılmıştır. Ayrıca benzer algoritma çalışmalarının, hastalara ait detaylı klinik bilgi ile birlikte değerlendirilerek tanıda kullanılacak algoritmalara karar verilmesi için uygun bir yaklaşım olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Tramont EC. *Treponema pallidum* (Syphilis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. New York: Churchill Livingstone, 2010:3035-55. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06839-3.00238-1
2. Elmi Ş. HIV/AIDS, HBV, HCV, Sifiliz ve Genital herpes'in toplumda ve riskli davranış modeli gösteren seks işçilerinde karşılaştırılması [Uzmanlık tezi] İstanbul: TC Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 2007.
3. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: Review with emphasis on clinical, epidemiologic and some biologic features. Clin Microbiol Rev. 1999;12(2):187-209.
4. Mark H, Jordan ET, Cruz J, Warren N. What's new in sexually transmitted infection management: changes in the 2010 guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention. J Midwifery Womens Health. 2012;57(3):276-84. https://doi.org/10.1111/j.1542-2011.2012.00179.x
5. Ağaçfidan A. Cinsel yolla bulaşan hastalıklarda laboratuvarda tanı olanakları. ANKEM Derg. 2012;26(Ek 2):E189-97.
6. Tong ML, Lin LR, Liu LL, et al. Analysis of 3 algorithms for syphilis serodiagnosis and implications for clinical management. Clin Infect Dis. 2014;58(8):1116-24. https://doi.org/10.1093/cid/ciu087

7. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. Direct comparison of the traditional and reverse syphilis screening algorithms in a population with a low prevalence of syphilis. J Clin Microbiol. 2012;50(1):148-50. https://doi.org/10.1128/JCM.05636-11
8. Simčič S, Potočnik M. Serological diagnosis of syphilis: a comparison of different diagnostic methods. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat. 2015;24(2):17-20. https://doi.org/10.15570/actaapa.2015.6
9. Seña AC, White BL, Sparling PF. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. Clin Infect Dis. 2010;51(6):700-8. https://doi.org/10.1086/655832
10. Greer L, Wendel GD Jr. Rapid diagnostic methods in sexually transmitted infections. Infect Dis Clin North Am. 2008;22(4):601-17. https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.05.010
11. Özbek ÖA, Doğan Y. Taramada treponemal test kullanan bir sifiliz tanı algoritmasının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2011;45(1):93-103.
12. Sethi S, Mewara A, Hallur V, Prasad A, Sharma K, Raj A. Rising trends of syphilis in a tertiary care center in North India. Indian J Sex Transm Dis. 2015;36(2):140-3. https://doi.org/10.4103/0253-7184.167137
13. Adışen E, Öztaş M, Gürer MA. 1994-2006 yılları arasında izlediğimiz sifilizli hastaların demografik bulguları. Türkderm. 2008;42(1):9-12.
14. Ziver T, Yüksel P, Güngördü Z, ve ark. Sifiliz enfeksiyonlarının tanısında kullanılan Rapid Plasma Reagin (RPR) ve Treponema pallidum Hemaglutinasyon Assay (TPHA) test sonuçlarının 2005-2010 yılları arasındaki değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2011;68(1):1-7. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2011.88700
15. Lee K, Park H, Roh EY, et al. Characterization of sera with discordant results from reverse sequence screening for syphilis. Biomed Res Int. 2013;2013:269347. https://doi.org/10.1155/2013/269347
16. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. *Treponema*-specific tests for serodiagnosis of syphilis: comparative evaluation of seven assays. J Clin Microbiol. 2011;49(4):1313-7. https://doi.org/10.1128/JCM.02555-10
17. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Discordant results from reverse sequence syphilis screening - Five Laboratories, United States, 2006-2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011;60(5):133-7.
18. Mishra S, Boily MC, Ng V, et al. The laboratory impact of changing syphilis screening from the Rapid-Plasma Reagin to a treponemal enzyme immunoassay: a case-study from the Greater Toronto area. Sex Transm Dis. 2011;38(3):190-6. https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3181f07e91
19. Nah EH, Cho S, Kim S, Cho HI, Chai JY. Comparison of traditional and reverse syphilis screening algorithms in medical health checkups. Ann Lab Med. 2017; 37(6):511-5. https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.511
20. Huh JH, Chung JW, Park SY, Chae SL. Comparison of automated treponemal and nontreponemal test algorithms as first-line syphilis screening assays. Ann Lab Med. 2016;36(1):23-7. https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.1.23
21. Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014;28(12):1581-93. https://doi.org/10.1111/jdv.12734
22. Loeffelholz MJ, Binnicker MJ. It is time to use treponema-specific antibody screening tests for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol. 2012;50(1):2-6. https://doi.org/10.1128/JCM.0

Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(1):78-85
doi:10.5222/TMCD.2018.078

Araştırma

İdrarda Lökosit / Bakteri Analizi Yapan Akım Sitometri Cihazı Sonuçları ile İdrar Kültürü Sonuçlarının Karşılaştırılması

Emel ÜZMEZ*, Serap YAĞCI*, Mihriban YÜCEL*, Buğra Bilge KESEROĞLU, Ayşe Esra KARAKOÇ*, Bedia DİNÇ***

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

***Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Ankara*

ÖZ

Amaç: *Akım sitometri yöntemi ile elde edilen sonuçların, kültür sonuçları ile karşılaştırılması ve buna göre bir eşik değerin altında lökosit ve bakteri sayısı içeren örneklerde ekim yapılmasını ekarte eden hızlı bir tarama algoritması oluşturulması amaçlandı. Çalışmanın ikinci basamağında ise üremesiz-kontamine idrar örneklerinin kısa sürede sonuçlandırılması ile gereksiz antibiyotik kullanımın ne kadar önüne geçilebileceği değerlendirildi.*

Gereç ve Yöntem: *Tüm kliniklerden laboratuvara kültür için gönderilen, 995 hastanın idrar örneği aynı zamanda akım sitometri cihazında çalışıldı. Akım sitometri cihazında elde edilen sonuçlar kültür sonuçları ile karşılaştırıldı. Kültür sonucu beklenmeden başlanan ampirik antibiyotik kullanımını değerlendirmek amacıyla; üroloji polikliniğinden başvurmuş ve idrar kültürü değerlendirilmiş 208 hastadan antibiyotik tedavisi başlananlar kayıt altına alındı.*

Bulgular: *Akım sitometri yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlar bize tüm kliniklerden gelen örneklerimizin %31'inde idrar kültürü işlemlerinin yapılmasına gerek olmadığını gösterdi. Üroloji Polikliniği'nden gelen örneklerin ise %29.3'ünde idrar kültürü işlemlerinin yapılmasına gerek olmadığı ve akım sitometri tekniğinin üremesiz olarak öngördüğü hastaların %23'üne gereksiz antibiyotik başlandığı saptandı.*

Sonuç: *Bu teknik hızlı tarama testi olarak kullanıldığında, idrar örneklerinin yoğun olduğu laboratuvarlarda iş yükünü ve maliyeti azaltacak, dakikalar içerisinde negatif sonuç verilebilmesi ile aynı zamanda gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılmasına da belli ölçüde katkı sağlayacaktır.*

Anahtar kelimeler: *Akım sitometri, idrar kültürü, tarama testi*

ABSTRACT

Comparison of Results of Urine Cultures and a Flow Cytometric Device That Analyses Urinary Leukocytes/ Bacteria

Objective: *It was aimed to make a fast screening algorithm by comparing the results obtained by the flow cytometry method with the urine culture results so as to to eliminate cultivation in samples containing a number of leukocytes and bacteria below a threshold value. In the second step of the study; it was evaluated to what extent unnecessary antibiotic usage could be avoided by finalizing the results of negative-contaminated urine specimens in a short-term.*

Material and Methods: *The urine samples of 995 patients from all clinics submitted to our laboratory for culture were also tested in a flow cytometry device. The results obtained from the flow cytometry device were compared with the culture results. In the second step, the use of antibiotics in 208 patients referred from the urology clinic were recorded, in order to evaluate the empirical use of antibiotics, which were initiated without the culture results were obtained.*

Results: *The results we obtained with the flow cytometry method showed that there was no need to carry out urine culture in 31% of our samples that were sent from all the clinics. As to the samples obtained from the urology clinic, it was detected that there was no need to carry out urine culture in 29.3%; and 23% of the patients whose urine cultures were detected as "no growth" on flow cytometry predicted had been started on unnecessary antibiotic therapy.*

Conclusion: *When this technique is used as a rapid screening test, it will reduce the workload and cost in laboratories in which urine specimens are frequently sent for analysis; also contribute to a certain extent in reducing unnecessary antibiotic use by providing negative results within minutes.*

Keywords: *Comparison: flow cytometry and urine cultures*

Alındığı tarih: 05.06.2017
Kabul tarihi: 02.01.2018
Yazışma adresi: Emel Üzmez, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
e-posta: uzmezemel@gmail.com

GİRİŞ

İdrar yolu enfeksiyonları, antibiyotik kullanımı gerektiren endikasyonların başında yer almaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarına kültür olarak gönderilen örneklerin büyük çoğunluğunu idrar örnekleri oluşturmaktadır. Kültür sonuçlarının zaman alıcı olması ve büyük bir çoğunluğunun üremesiz ve kontaminasyon olarak raporlanması nedeniyle klinisyenler çoğu zaman kültür sonuçlarının raporlanmasını beklemeden hastaların semptomlarına, klinik bulgularına ve idrar tetkiki sonuçlarına dayanarak sıklıkla ampirik antibiyotik tedavisini yeğlenmektedir. Üremesiz ve kontaminasyon olarak raporlanacak örneklerin güvenilir bir tarama testi ile belirlenerek bu örneklerde kültür işleminin ekarte edilmesi ile laboratuvardaki iş yükünün ve maliyetin azaltılabileceği öne sürülmektedir[1,2]. Bu örneklerin aynı gün içerisinde sonuçlanabiliyor olması gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılmasına da katkı sağlayacağı düşünülmektedir[2,3]. İdrar yolu enfeksiyonu tanısı için çok çeşitli tarama testleri bulunmaktadır. Bunların başlıcaları arasında lökosit esteraz, nitrat redüktaz ve Gram boyama yöntemleri gibi metodlar yer almaktadır. Günümüzde tarama testi olarak akım sitometri yöntemleri de idrar yolu enfeksiyonu tanısı için kullanılmaktadır[4,5]. Son yapılan çalışmalara göre, akım sitometri yöntemi tarama testi olarak kullanıldığında kültür işlemlerinin miktarının azaldığı gösterilmiştir[6]. Bu yöntemle idrar analizi yapan Sysmex UF-1000i cihazı (Sysmex UF-1000i, Japonya) floresan boya ile hücreleri boyayarak mililitredeki lökosit ve bakteri miktarını belirtmektedir. Ek olarak mikroorganizmanın kok, basil veya maya olduğunu belirterek morfolojisi hakkında da bilgi vermektedir.

İki basamaklı olarak planlanan bu çalışmanın ilk aşamasında, akım sitometri yöntemi (Sysmex UF-1000i) ile elde edilen sonuçların, kültür sonuçları ile karşılaştırılması ve buna göre bir eşik değerin altında lökosit ve bakteri sayısı içeren örneklerde ekim yapılmasını ekarte eden hızlı bir tarama algoritması oluşturulması amaçlandı. Çalışmanın ikinci basamağında ise üremesiz-kontamine idrar örneklerinin kısa sürede sonuçlandırılması ile gereksiz yere başlanacak olan ampirik antibiyotik kullanımın ne kadar azaltılabileceği değerlendirildi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmanın ilk aşamasında; Haziran 2016-Ağustos 2016 tarihleri arasında hastanemizin tüm poliklinik, servis ve yoğun bakımlarından laboratuvara gönderilen idrar örnekleri 0.01 mL kalibre öze ile %5 koyun kanlı agar ve EMB agara ekildi. Thoma lamı ile santrifüj edilmemiş idrarda lökosit sayımı yapıldı. İlave olarak Gram boyama yöntemi uygulanmadı. Ekimi yapılan plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kültür işlemleri tamamlanan idrar örnekleri eş zamanlı olarak Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japonya) akım sitometri cihazında çalışıldı; idrarın mikrolitresindeki lökosit sayısı ve toplam bakteri sayısı belirlendi. Kolonizasyon, kontaminasyon veya gerçek enfeksiyon etkeni yorumunu yapabilmek için idrardaki piyüri varlığı ile birlikte kültür plaklarındaki koloni morfolojileri ve koloni sayıları incelendi. İnkübasyon sonunda ≥ 104 kob/mL üreme saptanan ve ≥ 10 lökosit/mm3 saptanan idrar örnekleri "spesifik üropatojen üredi" olarak raporlandı. Üç ya da daha fazla sayıda mikroorganizma üremesi değerlendirilen örnekler "üretral flora bakterileri ile kontaminasyon" olarak raporlandı. Kültür sonuçları ile UF-1000i sonuçlarının karşılaştırılması ROC analizi ile yapıldı. Bakteri ve lökosit eşik değerleri için cinsiyet ve yaşa göre belirlenen hasta gruplarına göre "ROC Curve" eğrisi çizildi. İdrar kültürü sonucuna göre spesifik üropatojen üremesi olan hastalar "pozitif"; ("üreme olmadı" ve "üretral flora bakterileri ile kontaminasyon") olan hastalar ise "negatif" olarak kabul edildi. Kültür sonuçları ile UF-1000i sonuçlarının karşılaştırılmasında en yüksek duyarlılığa ve

en yüksek negatif öngörü değerine ulaşabilmek için farklı farklı bakteri/lökosit eşik değerleri kullanıldı. Negatif öngörü değerimizin (NÖD) %100 olduğu bakteri/lökosit değerleri eşik değer olarak belirlendi. Dokuz yüz doksan beş hasta örneğine dâhil olan, üroloji polikliniğinden laboratuvara kabul edilmiş 208 idrar kültürü bulunan hasta grubunda ilave olarak antibiyotik kullanımları kayıt altına alındı. Buna göre kültür sonucu beklenmeden başlanmış olan ampirik antibiyotik kullanımı değerlendirildi. İdrar kültürü sonucunda ("üreme olmadı" ve "üretral flora bakterileri ile kontaminasyon") olan hastalara herhangi bir tedavi başlanmayacağı için bu numunelerde UF-1000i ile kültür işlemlerini ekarte ettiğimizde, ampirik antibiyotik kullanımının ne kadar azaltılabileceği hesaplandı.

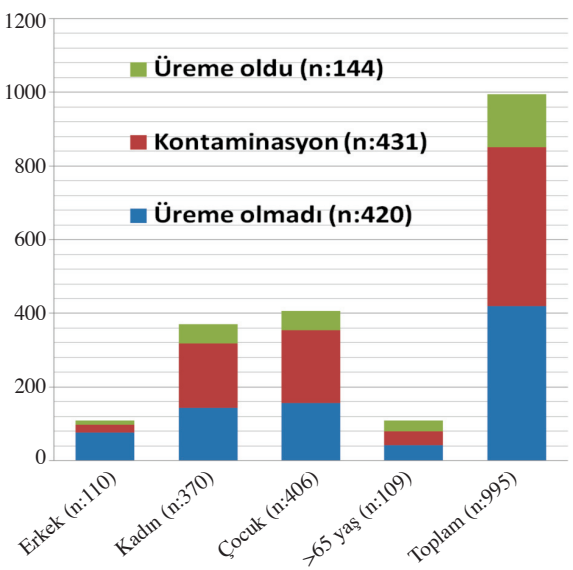
BULGULAR

Hastanemizin tüm poliklinik, servis ve yoğun bakımlarından laboratuvarımıza idrar kültürü istemiyle gönderilen 995 idrar numunesi değerlendirildi. Değerlendirmeye alınan idrar kültürlerinin %11'inin erkek hastalara (n=110), %37'si kadın hastalara (n=370), %41'inin çocuk hastalara (n=406), %11'inin 65 yaş üstü hastalara (n=109) ait olduğu görüldü. İdrar kültürü sonuçları incelendiğinde, örneklerin %14'ünde spesifik üropatojen üremesi olduğu, %43'ünde üretral flora bakterileri ile kontaminasyon olduğu ve %42'sinde üreme olmadığı görüldü.

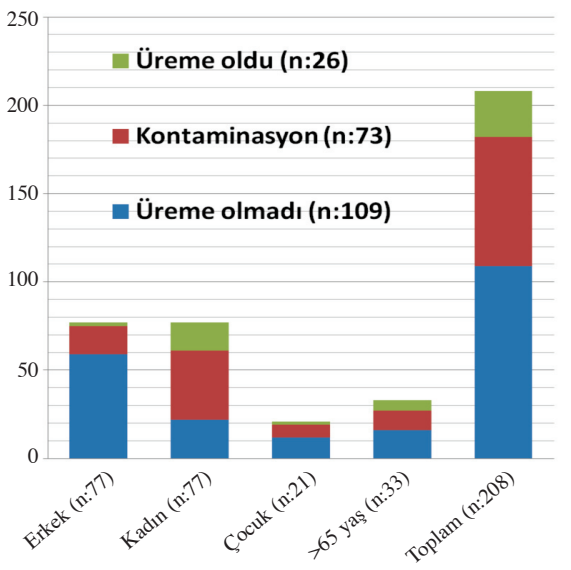
Antibiyotik tedavisi kullanımı kayıt altına alınmış olan Üroloji Polikliniği'nden laboratuvara kabul edilen hasta grubunda (n=208 hasta) idrar kültürlerinin %37'sinin erkek hastalara (n=77), %37'sinin kadın hastalara (n=77), %10'unun çocuk hastalara (n=21), %16'sının 65 yaş üstü hastalara (n=33) ait olduğu görüldü. Antibiyotik tedavisi kullanımı kayıt altına alınmış olan bu grupta idrar kültürü sonuçlarının %13'ünde spesifik üropatojen üremesi olduğu, %35 inde üretral flora bakterileri ile kontaminasyon olduğu ve %52 sinde üreme olmadığı görüldü. İdrar kültürü sonuçlarının hasta gruplarına göre dağılımı Tablo 1'de görülmektedir.

UF-1000i cihazının sonuçları ile kültür sonuçları karşılaştırıldı. İdrar kültürü sonucuna göre

Tablo 1. İdrar kültürü sonuçlarının hasta gruplarına göre dağılımı.



Tüm Kliniklerden Gelen Hastalar



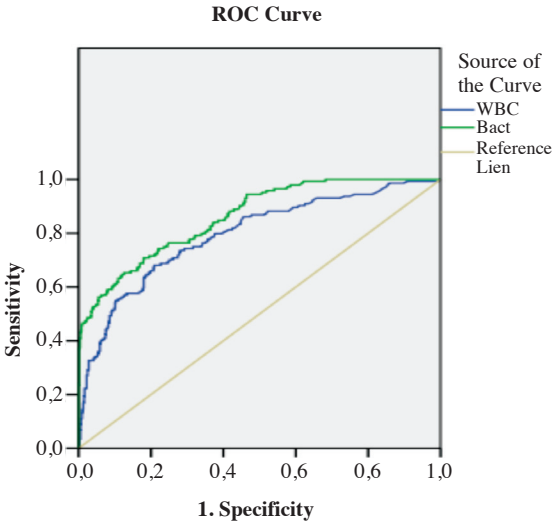
Üroloji Polikliniği'nden Gelen Hastalar

spesifik üropatojen üremesi olan hastalar "pozitif"; "üreme olmadı" ve "üretral flora bakterileri ile kontaminasyon" olan hastalar ise "negatif" olarak kabul edildi. Testin taramada kullanılabilecek güvenilir bir yöntem olduğunu göstermek için ROC (receiver operating curve) analizi yapılarak ROC eğrisi altında kalan alanın (AUC) 1'e yakınlığı hesaplandı. UF-1000i ile en yüksek duyarlılığa ve en yüksek negatif öngörü değerine ulaşabilmek için farklı farklı bakteri/lökosit eşik değerleri kullanıldı. Negatif öngörü değerimizin (NÖD) %100 olduğu, yani "negatif" idrar örneklerini %100 doğrulukla belirleyebileceğimiz bakteri/lökosit değerleri eşik değer olarak belirlendi.

Hastaların tümü incelendiğinde, "negatif" örnekleri %100 doğrulukla belirleyebileceğimiz mikrolitredeki bakteri ve lökosit eşik değerleri 50/μl ve 10/μl olarak bulunmuştur. Bu eşik değerler ile ROC eğrisi çizildiğinde lökosit ve bakteri sayımları için eğri altında kalan sırasıyla 0.793 ve 0.861 olarak 1'e yakın olarak bulunmuştur. İdrar kültürü sonucunda ("üreme olmadı" ve "üretral flora bakterileri ile kontaminasyon") olan hastalara herhangi bir tedavi başlanmayacağı için "negatif" olarak kabul ettiğimiz bu örneklerde kültür işlemlerini ekarte edebileceğimiz eliminasyon oranımız %24.22 olarak hesaplanmıştır.

Yaş ve cinsiyet farklılıkları gözetilerek yapılan gruplandırmaya göre ayrı ayrı bakteri/lökosit eşik değerler kullanıldığında eliminasyon oranımız daha yüksek (%31) bulunmuştur. Yaş ve cinsiyete göre saptanan eşik değerler ile ROC eğrisi çizildiğinde lökosit ve bakteri için AUC değerinin 1'e yakın olduğu (sırasıyla 0.732 ile 0.830 0.792 ile 0.971) saptanmıştır.

Tüm hastalar için ve hasta gruplarına göre yapılan analizlere ilişkin ROC eğrileri Şekil 1 ve 2'de görülmektedir.

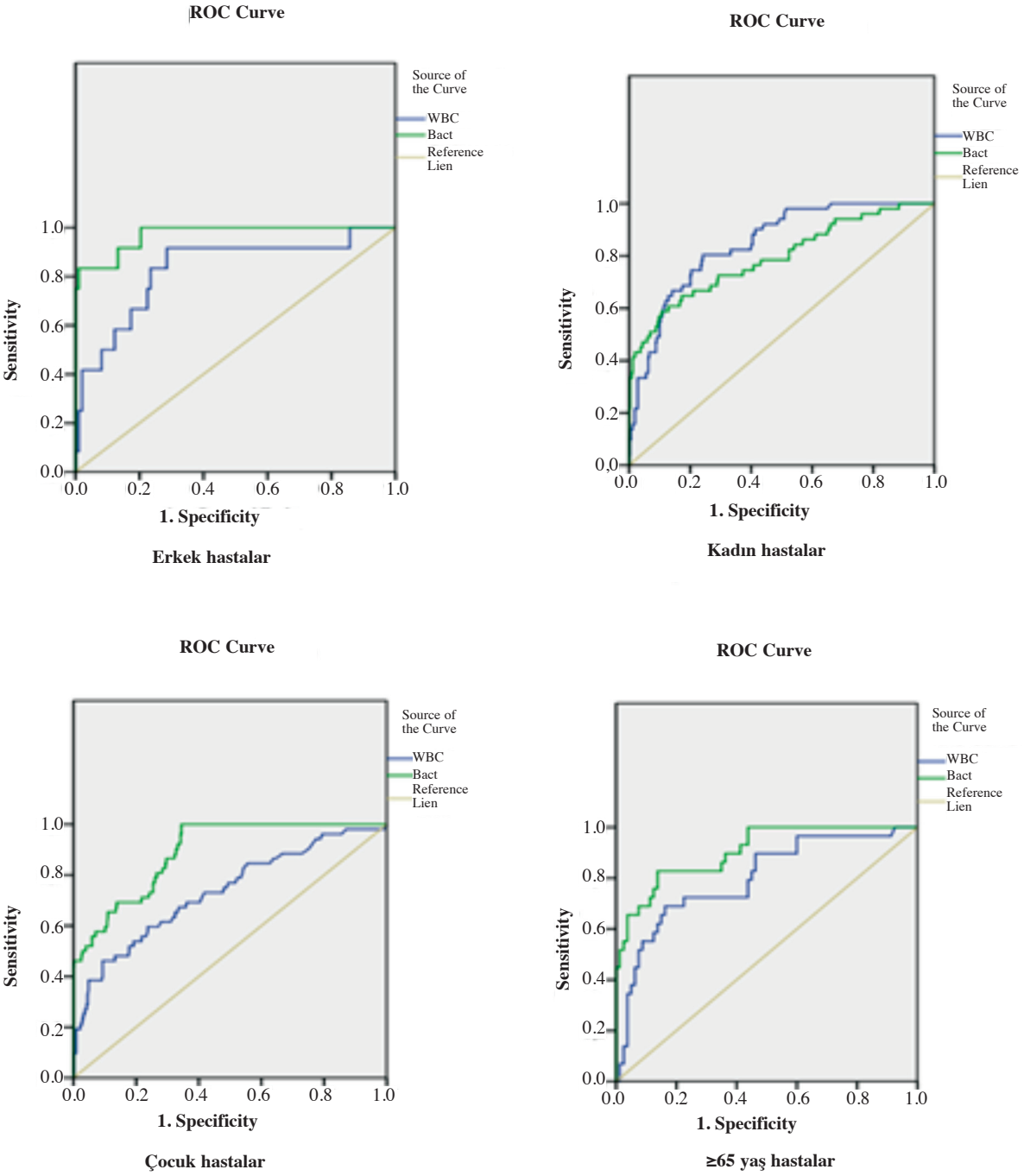


Şekil 1. Tüm hastalar için ROC eğrisi.

Hasta gruplarına göre saptadığımız eşik değerler ve eliminasyon oranlarımızı içeren analiz sonuçları Tablo 2 ve 3'te görülmektedir.

Hasta gruplarına göre bakteri ve lökosit eşik değerlerleri beraber dikkate alınarak, tüm kliniklerden gelen idrar örnekleri incelendiğinde, erkek hastalarda 110 örneğin 44'ü (%40), kadın hastalarda 370 örneğin 49'u (%13.2), çocuk hastalarda 406 örneğin 197'si (%48.5), 65 yaş üstü hastalarda 109 örneğin 19'u (%17.4) kültürle %100 uyumlu şekilde "negatif" olarak bulunmuştur. Çocuk hastalardaki kontaminasyon oranımızın çok yüksek olması nedeniyle, bakteri eşik değeri diğer gruplara göre daha yüksek (100/μl) olarak belirlenmiştir. Akım sitometri yönteminin verdiği sonuçlarda yalancı pozitiflikler olmasına rağmen, yalancı negatiflik saptanmadı. Böylelikle tarama testinde pozitif olan örnekler kültür ekimine alınarak klinisyene hatalı sonuç verilmesinin önüne geçilmiş oldu. Tüm kliniklerden gelen örnekler dikkate alındığında, toplam 309 (%31) örnek için %100 negatif öngörü değerine ulaşılmıştır. Tablo 4'te tüm kliniklerden gelen kültür sonuçları ile Sysmex sonuçlarımızın karşılaştırılması görülmektedir.

Antibiyotik kullanımı kayıt altına alınan Üroloji



Şekil 2 Hasta grupları için ROC eğrileri.

Polikliniği'nden gelen idrar örnekleri, her hasta grubu için belirlediğimiz eşik değerler dikkate alınarak incelendiğinde, erkek hastalarda 77 örneğin 29'u (%37.6), kadın hastalarda 77 örneğin 12'si (%15.5), çocuk hastalarda 21 örneğin 12'si (%57.1), 65 yaş üstü hastalarda 33 örneğin 8'i (%24.2) kültürle %100 uyumlu şekilde negatif bulundu. Üroloji polikliniğinden gelen hastaların kültür sonuçları ile Sysmex sonuçlarımızın karşılaştırılması ise Tablo 5'te görülmektedir.

Antibiyotik kullanımı da değerlendirilmiş olan üroloji hasta grubunda toplam 208 örneğin 61'inde (%29.3) %100 negatif öngörü değerine

Tablo 2. Gruplandırma yapılmadan önce ve sonra elde edilen analiz sonuçları.

	Bakteri (/μl)	Lökosit (/μl)	NÖD (%)	PÖD (%)	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	Eliminasyon Oranı (%)
Gruplandırma öncesi tüm hastalar	50	10	100	19.10	100	28.32	24.22
Erkek	70	15	100	18	100	44	40
Kadın	60	10	100	15	100	15	13.2
Çocuk	100	15	100	24.88	100	55.65	48.5
≥65 YAŞ	60	10	100	32.22	100	23.75	17.4
Gruplandırma sonrası total eliminasyon oranı (%)							3,1

**NÖD: Negatif Öngörü Değeri*
***PÖD: Pozitif Öngörü Değeri*

Tablo 3. Üroloji Polikliniği'nden gelen örnekler için analiz sonuçları.

	Bakteri (/μl)	Lökosit (/μl)	NÖD (%)	PÖD (%)	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	Eliminasyon Oranı (%)
Erkek	70	15	100	4.17	100	38.67	37.6
Kadın	60	10	100	24.62	100	19.67	15.58
Çocuk	100	15	100	22.22	100	63.16	57.14
≥65 YAŞ	60	10	100	24	100	29.63	24.24
Total eliminasyon oranı							29.3

NÖD: Negatif öngörü değeri ; PÖD: Pozitif öngörü değeri

Tablo 4. Tüm kliniklerden gelen kültür sonuçları ile Sysmex-UF 1000i sonuçlarının karşılaştırılması.

		Kültür			
		Üreme Oldu	Kontaminasyon	Üreme Olmadı	Toplam
Sysmex UF-1000i	Pozitif	144	309	233	686
	Negatif	0	123	186	309
	Toplam	144	432	419	995

Tablo 5. Üroloji Polikliniği kültür sonuçları ile Sysmex-UF 1000i sonuçlarının karşılaştırılması.

		Kültür			
		Üreme Oldu	Kontaminasyon	Üreme Olmadı	Toplam
Sysmex UF-1000i	Pozitif	26	67	54	147
	Negatif	0	42	19	61
	Toplam	26	109	73	208

ulaşıldı. Bu hasta grubunda kültür sonucu beklenmeden başlanan antibiyotik kullanımı değerlendirildiğinde, UF-1000i'nin üremesiz öngördüğü 61 hastanın 14'üne (%23) gereksiz antibiyotik başlandığı saptandı.

Sysmex-UF 1000i ile elde ettiğimiz sonuçlar bize tüm kliniklerden gelen örneklerimizin %31'inde idrar kültürü işlemlerini elimine edebileceğimizi gösterdi. Antibiyotik kullanımı kayıt altına alınan üroloji polikliniği grubunda UF 1000i'nin üremesiz olarak öngördüğü hastaların %23'üne gereksiz antibiyotik başlandığı belirlenmiştir.

TARTIŞMA

İdrar yolu enfeksiyonu tanısında, hızlı metodların değerlendirilmesiyle ilgili çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. En son olarak da akım sitometri yöntemi bunlar arasında yer almaktadır. Bu çalışmalar idrar örneğinde bakteri ve/veya lökositin varlığına dayandırılmaktadır.

İdrar yolu enfeksiyonu tanısında kullanılan tarama testlerinin duyarlılığı, özgüllüğünden daha önemlidir[7]. Kültür işlemlerini ekarte etmede kullanılacak tarama testinin en iyi performansı sunması için yüksek negatif öngörü değerine sahip olması ve hatalı negatif sonuçlarını en aza indirmesi gerekmektedir. Böylelikle tarama testinde pozitif olan örnekler kültür ekimine alınacak ve klinisyene hatalı sonuç verilmeyecektir[8]. Yanlış pozitifliklerin sayısından çok önemli olan yanlış negatif sonuç vermemektir. Sysmex UF100 ile yanlış negatifliklerini düşük oranda saptayan çalışmalar bulunmaktadır[9,10]. Akım sitometri yönteminde en iyi peformansın sağlandığı tek bir sabit eşik değer bulunmamaktadır. Yapılmış çalışmalarda, araştırmacıların en yüksek duyarlılığa ulaşabilmek için birbirinden farklı bakteri/lökosit eşik değerleri belirledikleri görülmektedir. Duyarlılığı yükseltmek için bazı çalışmalarda, eşik değer olarak bakteri sayımı tek başına kullanılıp lökosit sayımı değerlendirme dışı bırakılmıştır[4,11]. Yine yalancı negatif sayısını azaltmak ve duyarlılığı yükseltmek adına cinsiyete göre farklı eşik değerler kullanan çalışmalar da bulunmaktadır[8]. Çalışmamızda ise bakteri ve lökosit eşik değerlerini 50/μl ve 10/μl olarak belirlediğimizde %100 duyarlılığa ulaşırken, yaş ve cinsiyete göre farklı eşik değerler belirlendiğinde yine %100 duyarlılıkla eliminasyon oranımızı %24.22'den %31'e yükseltebileceğimiz görüldü. Bu gruplandırma sonrası çocuk hasta grubunda bakteri eşik değerimiz 100/μl'e yükselmiştir. Bakteri eşik değerini yüksek tutarak duyarlılığını artıran başka çalışmalar da bulunmaktadır. Manoni ve ark.[7] bakteri 125/μl ve lökosit 40/μl eşik değerleri kullanırken, Giesen ve ark.[11] bakteri 288.9/μl ve lökosit 31.8/μl eşik değerler ile çalıştıklarını belirtmişlerdir. UF100 ve UF500'den sonra güncellenen Sysmex UF1000i ile yapılan son yıllardaki çalışmalara göre, % 86'dan %100'e kadar duyarlılık bildirilirken, %35'ten %50'nin üzerine kadar kültür işlemlerini elimine edilebileceği belirtilmiştir[7,11-15]. İş yükü fazla olan laboratuvarlarda kültür işlemlerinin eliminasyonu ile iş yükünün ve maliyetin azaltılabileceğini söyleyen yayınlar bulunmaktadır[14]. Ülkemizde, İlki ve ark.'nın[12] yaptığı çalışmada, idrar kültürü öncesi UF-1000i ile yapılan tarama testi sonucu %24 maliyetin azaltılabileceği belirtilmiştir.

Costelloe ve ark.'nın[16] yaptığı meta-analiz çalışmasına göre, idrar örneklerinde saptanan bakteriyel antimikrobiyal direncinin birinci basamakta idrar yolu enfeksiyonunda reçete edilen antibiyotiklerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Boonen ve ark.[6] üroloji hasta grubunu içeren bir çalışmada, Sysmex UF-500i ile 281 örneğin % 49'unu elimine edebildiklerini ve negatif örneklere hızlı sonuç verebildiklerinde %20 antibiyotik kullanımını azaltabileceklerini değerlendirmişlerdir. Çalışmamızda benzer olarak, Üroloji Poliklinği'nden gelen örneklerimizin %29.3'ünde idrar kültürü işlemlerini elimine edebileceğimizi ve üremesiz olarak öngörülen hastaların %23'üne gereksiz antibiyotik başlandığı saptanmıştır. Negatif bir sonucun kısa sürede raporlanacak olması antibiyotik kullanımında azaltacaktır[14,17].

Sonuç olarak, Sysmex UF1000i sistemi hızlı tarama testi olarak kullanıldığında %100 duyarlılıkla ve %100 negatif öngörü ile örneklerin %31'inin kültür işlemlerine gerek kalmadan elimine edilebileceği görüldü Ayrıca antibiyotik kullanımı kaydedilen üroloji polikliniğinden gelen hasta grubumuzda ise; UF 1000i'nin üremesiz olarak öngördüğü bireylere negatif raporunu hızlı ulaştırabildiğimizde gereksiz antibiyotik kullanımının %23 azaltılabileceği belirlendi.

Bu teknik hızlı tarama testi olarak kullanıldığında, bizim laboratuvarımız gibi idrar örneklerinin yoğun olduğu laboratuvarlarda iş yükünü ve maliyeti azaltabilecektir. Laboratuvar kaynaklarının etkin ve ekonomik kullanımını sağlayan bu tarz otomatize sistemlerle, güvenilir bir şekilde, dakikalar içerisinde negatif sonuç verilebilmesi aynı zamanda gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılmasına da belli ölçüde katkı sağlayacaktır.

Ancak her laboratuvarın kendi hizmet ettiği hasta populasyonunu ,altta yatan hastalıkların prevalansını bilmesi, seçeceği metodun kendi hasta kapasitesine uyumunu iyi değerlendirmesi gerekmektedir[18]. Örneğin, ürolojik anomalisi olan, bağışıklığı baskılanmış hasta grupları, gebeler, yenidoğan gibi özellikli bazı hasta gruplarında, kültür hâlâ altın standart yöntem olarak yerini koruduğundan, bu hasta gruplarında ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Okada H, Sakai Y, Miyazaki S, Arakawa S, Hamaguchi Y, Kamidono S. Detection of significant bacteriuria by automated urinalysis using flow cytometry. J Clin Microbiol. 2000;38(8):2870-2.
2. Tille PM. Infections of the urinary tract. In. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th edn. Elsevier, St. Louis, 2014:919-30.
3. Sterry-Blunt RE, Randall KS, Doughton MJ, Aliyu SH, Enoch DA. Screening urine samples for the absence of urinary tract infection using the sediMAX automated microscopy analyser. J Med Microbiol. 2015;64(6):605-9. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000064
4. Kadkhoda K, Manickam K, Degagne P, et al. UF-1000i flow cytometry is an effective screening method for urine specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(2):130-6. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.013
5. Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: a comprehensive review. Am Fam Physician. 2005;71(6): 1153-62.
6. Boonen KJ, Koldewijn EL, Arents NL, Raaymakers PA, Scharnhorst V. Urine flow cytometry as a primary screening method to exclude urinary tract infections. World J Urol. 2013;31(3):547-51. https://doi.org/10.1007/s00345-012-0883-4
7. Manoni F, Fornasiero L, Ercolin M, et al. Cutoff values for bacteria and leukocytes for urine flow cytometer Sysmex UF-1000i in urinary tract infections. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65(2):103-7. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.06.003
8. Jolkkonen S, Paattiniemi EL, Kärpänoja P, Sarkkinen H. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture. J Clin Microbiol. 2010;48(9):3117-21. https://doi.org/10.1128/JCM.00617-10
9. Manoni F, Valverde S, Antico F, Salvadego MM, Giacomini A, Gessoni G. Field evaluation of a second-generation cytometer UF-100 in diagnosis of acute urinary tract infections in adult patients. Clin Microbiol Infect. 2002;8(10):662-8. https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00452.x
10. Zaman Z, Roggeman S, Verhaegen J. Unsatisfactory performance of flow cytometer UF-100 and urine strips in predicting outcome of urine cultures. J Clin Microbiol. 2001;39(11):4169-71. https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4169-4171.2001
11. Giesen CD, Greeno AM, Thompson KA, Patel R, Jenkins SM, Lieske JC. Performance of flow cytometry to screen urine for bacteria and white blood cells prior to urine culture. Clin Biochem. 2013;46(9):810-3. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.005
12. Ilki A, Ayas R, Ozsoy S, Soyletir G. Cost-effectiveness of a new system in ruling out negative urine cultures on the day of administration. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(7):1119-23. https://doi.org/10.1007/s10096-017-2898-7
13. Pieretti B, Brunati P, Pini B, et al. Diagnosis of bacteriuria and leukocyturia by automated flow cytometry compared with urine culture. J Clin Microbiol. 2010;48(11):3990-6. https://doi.org/10.1128/JCM.00975-10
14. Broeren MA, Bahçeci S, Vader HL, Arents NL. Screening for urinary tract infection with the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer. J Clin Microbiol. 2011;49(3):1025-9. https://doi.org/10.1128/JCM.01669-10
15. Wang J, Zhang Y, Xu D, Shao W, Lu Y. Evaluation of the Sysmex UF-1000i for the diagnosis of urinary tract infection. Am J Clin Pathol. 2010;133(4):577-82. https://doi.org/10.1309/AJCP1GT2JXOCQBCZ
16. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2010;340: c2096. https://doi.org/10.1136/bmj.c2096
17. Thompson R, Gammie A, Lewis D, Smith R, Edwards C. Evidence review: automated urine screening systems: CEP10030. NHS Purchas Supply Agency Informing Procurement. 2010:1-46.
18. Bartlet R, Galen R. Predictive value of urine culture. J Infect Dis. 1983;79(6):179-82. https://doi.org/10.1093/ajcp/79.6.756

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):106-113, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.106

Araştırma

Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinden Elde Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Çeşitli Virülans Faktörlerine Kurkuminin Etkisi †

Reyhan MUTLU, Aynur EREN TOPKAYA
Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ

ÖZ

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa sahip olduğu virülans faktörleri ve antibiyotiklere direnç mekanizmaları ile kistik fibrozlu hastalarda tedavisi zor olan solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Kurkuminin anti-inflamatuvar, anti-tümör gibi etkilerinin yanı sıra antibakteriyel etkiye de sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın amacı, kistik fibrozlu hastaların solunum yolu örneklerinden elde edilen P. aeruginosa izolatlarının çeşitli virülans faktörlerine (biyofilm, elastaz, alkali proteaz) kurkuminin etkisinin araştırılmasıdır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmamızda, P. aeruginosa izolatlarının (n=65) kurkumin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri agar dilüsyon yöntemiyle çalışıldı. Virülans faktörlerinden biyofilm, elastaz ve alkali proteaz mikroplakta absorbans ölçümüne dayalı yarı kantitatif yöntemlerle araştırıldı. Virülans faktörü üretimi pozitif olan izolatlar aynı anda hem sub-MİK konsantrasyondaki kurkumine maruz bırakılarak hem de bırakılmadan virülans faktörü üretimini araştırmak için yeniden çalışıldı ve ölçülen absorbans değerleri istatiksel olarak karşılaştırıldı.*

Bulgular: *Çalışmamızda, izolatların 11'inin (%16) kurkumin MİK değeri 250-500 µg/ml arasında, 7'sinin (%11) kurkumin MİK değeri 501-1000 µg/ml arasında, 5'inin (%8) kurkumin MİK değeri 1001-1500 µg/ml arasında ve 42'sinin (%65) kurkumin MİK değeri 1500 µg/ml üzerinde saptandı. İzolatların %54'ünde biyofilm üretimi, %74'ünde elastaz üretimi ve %68'inde alkali proteaz üretimi pozitif bulundu. Çalışılan bu üç virülans faktörünün üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonlarda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.*

Sonuç: *Çalışmamızın sonuçlarına göre, in-vitro ortamda bir kez kurkumine maruz bırakılan kistik fibroz izolatlarının virülans faktörlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmamıştır. Bununla birlikte, kurkuminin toksik olmayan, anti-inflamatuvar ve anti bakteriyel bir madde olması nedeniyle bu hasta gruplarında uzun süreli kullanımının in-vivo etkilerinin de araştırılması uygun olacaktır.*

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa, kistik fibröz, kurkumin*

ABSTRACT

The Effect of Curcumin on Several Virulance Factors of Pseudomonas aeruginosa Isolates Obtained From Respiratory Tract Samples of Cystic Fibrosis Patients

Objective: *Pseudomonas aeruginosa causes respiratory tract infections that are difficult to treat in patients with cystic fibrosis because of the antibiotic resistance mechanisms and virulence factors. Curcumin has been found to possess antibacterial as well as antitumoral and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to investigate the effect of curcumin on several virulence factors (biofilm, elastase, alkaline protease) of P. aeruginosa isolates which were obtained from respiratory tract samples of cystic fibrosis patients.*

Material and Methods: *In our study, minimal inhibitory concentration (MIC) values of curcumin for P. aeruginosa isolates (n=65) were determined by agar dilution method. Production of three different virulence factors (elastase, alkaline protease, and biofilm) were investigated by semi-quantitative methods which relied on the measurement of absorbance in microtiter plates. The isolates which had a positive virulence factor production were retested for the production of virulence factors at the presence and absence of sub-MIC curcumin concentrations simultaneously and measured absorbance values were compared statistically.*

Results: *In our study, curcumin MICs of the 11 (16%) isolates were 250-500 µg/ml 501-1000 µg/m for 7 (11%), 1001-1500 µg/ml for 5 (8%), and above 1500 µg/ml for 42 (65%) isolates. Out of 65 isolates in 54% biofilm, in 74% elastase, and in 68% alkaline protease production were positive. In terms of virulence factor production, results didn't indicate a statistically significant difference between the absorbance values obtained with and without exposure to sub-MIC concentrations of curcumin.*

Conclusion: *In conclusion, there was no statistically significant decrease in the virulence factors of cystic fibrosis isolates which were once exposed to in vitro curcumin. However, because curcumin is a non-toxic, anti-inflammatory and anti-bacterial agent, it will be suitable to investigate the in vivo effects of long-term curcumin use in these patient groups.*

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa, cystic fibrosis, curcumin*

Alındığı tarih: 31.01.2017
Kabul tarihi: 02.05.2017
Yazışma adresi: Aynur Eren Topkaya, Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ
e-posta: aynurtopkaya@yahoo.com
† Bu çalışma, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (NKÜ BAP) tarafından desteklenmiştir.
Turk Mikrobiyol Cem Derg 2017;47(3):106-113 künyesi ile basılan makalenin düzeltilmiş ilk sayfa baskısıdır.

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 adları ve MİK veya PFGE gibi kısaltmalar ilk kullanıldıklarında tam olarak, açık şekilleriyle yazılmalı mikroorganizma adı daha sonraki kullanımlarda cins adının ilk harfi kullanılarak kısaltılmalıdır. *Staphylococcus aureus S. aureus* gibi. Paragraf başında ise bu kısaltma kullanılmamalı, isim tam olarak yazılmalıdır.
- *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 temel olarak Türkçe'ye uyarlanmış Vancouver yazım stili (Örnekler aşağıdadır) 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: Standart Dergi Makalesi: Courvalin P, Davies J. Mechanisms of resistance to aminoglycosides. Am J Med. 1977;62(6):868-72. doi:.....
- Dergi Ekinde (Supplement) yer alan makale: Snydman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. Chest. 2003;123(Suppl 5):S500-3. doi:.....
- Elektronik dergi makalesi: Lam PV, Tadros M, Fong IW. Mandibular osteomyelitis due to *Raoultella* species. JMM Case Rep. 2018;5. İnternet adresi: http://..... Erişim tarihi: ../../20.. doi:.....

B. Kitaplar

- Kitap: Appanna VD. Human Microbes - The Power Within Health, Healing and Beyond. Singapur: Springer Singapur; 2018.
- e-kitap: Appanna VD. Human Microbes - The Power Within Health, Healing and Beyond. Singapur: Springer Singapur; 2018. İnternet adresi: http://..... Erişim tarihi: ../../20..
- Kitap bölümü: Piret J. Antiviral drug resistance in herpesviruses. In: Berghuis A, Matlashewski G, Sheppard D, Wainberg MA (Eds.) Handbook of antimicrobial resistance. New York: Springer-Verlag, 2017:87-122. (Türkçe kitaplar için; cümle sonuna kitabında ifadesini ekleyiniz.)
- Kurumsal yayın: CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3. 3rd ed. CLSI, Wayne: ABD; 2008.
- Süreli resmi yayın: TC Sağlık Bakanlığı. Bulaşıcı hastalıklar sürveyans ve kontrol esasları yönetmeliği. Resmi Gazete. 30.05.2007(26537).
- Süreli resmi yayın (internet): TC Sağlık Bakanlığı. Bulaşıcı hastalıklar sürveyans ve kontrol esasları yönetmeliği. Resmi Gazete. 2007(26537). İnternet adresi: http://..... Erişim tarihi: ../../20..
- Kongre Bildiri Özeti: Başustaoğlu AC, Süzük S, Mumcuoğlu İ, ve ark. Kan kültürü uygulamalarının değerlendirilmesi: EpiCenter verilerinin kullanımı. XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya; 2016:TPS-85.
- Tez: Öktem İMA. Endoservikal sürüntü örneklerinde *Chlamydia trachomatis* hücre kültürü sonuçlarının direk floreson antikor (DFA) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile karşılaştırılması [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 1998.

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.