

Cilt / Volume 48

Sayı / Number 3

Eylül / September 2018

ISSN 0258-2171

e-ISSN 2458-7516



# Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

*Journal of Turkish Society of Microbiology*

- ✓ *Aspergillus fumigatus* Kompleksi: Zorlu Bir Patojende Yeni Bir Sorun, Azol Direnci
- ✓ Jasplakinolid ile F-actin Stabilizasyonu Uygulanan Endotel Hücrelerinde Difteri Toksini Trafiği
- ✓ *Exophiala dermatitidis* ve *Exophiala phaeomuriformis* Kökenlerinin Malaşit Yeşilini Renksizleştirme Aktivitelerinin Değerlendirilmesi
- ✓ İnsülin, Norepinefrin ve Östradiolün Çeşitli Mikroorganizmaların Üremesi Üzerine Etkisi
- ✓ *Giardia intestinalis* Genotiplerinin, Real-Time PCR Yöntemi ile Dışkı Örneklerinden Belirlenmesi

---

# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

*JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY*

---



**Cilt / Volume 48**

**Sayı / Number 3**

**Eylül / September 2018**



# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

## JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 48 Sayı / Number 3 Eylül / September 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

Ali Kudret Adiloğlu, Zonguldak  
Sinem Akçaltı, Manisa  
Elif Aktaş, İstanbul  
Orhan Cem Aktepe, İstanbul  
Gönül Aslan, Mersin  
Gülçin Bayramoğlu, Trabzon  
Asuman Birinci, Samsun

Gülendam Bozdayı, Ankara  
Ayşe Caner, İzmir  
Tuba Dal, Ankara  
Melek Demir, Denizli  
Sevgi Ergin, İstanbul  
Duygu Fındık, Konya  
Deniz Gür, Ankara

Süleyha Hilmioglu Polat, İzmir  
Arzu İli, İstanbul  
Ayşe Kalkancı, Ankara  
Nilgün Kaşifoğlu, Eskişehir  
Çiğdem Kayacan, İstanbul  
İpek Mumcuoğlu, Ankara  
Mehmet Özdemir, Konya

Tuncer Özekinci, Diyarbakır  
Duygu Perçin Renders, Afyon  
Fatih Şahiner, Ankara  
Şinasi Taner Yıldırım, Ankara  
Serap Süzük Yıldız, 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:** tmcdditor@gmail.com

www.tmc-online.org

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

**Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Her Hakkı Mahfuzdur.**

*Turkish Society of Microbiology, All Rights Reserved*

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

### Basım Yeri / Printed by



**Logos Yayıncılık Tic. A.Ş.**

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

34349 Gayrettepe-İstanbul

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

**e-posta:** logos@logos.com.tr

www.logosyayincilik.com

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



## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### DERLEME / REVIEW

- ***Aspergillus fumigatus* Kompleksi: Zorlu Bir Patojende Yeni Bir Sorun, Azol Direnci**  
*Aspergillus fumigatus Complex: A New Problem in a Challenging Pathogen, Azole Resistance*  
Dolunay GÜLMEZ ..... **153-166**

### ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS

- **Jasplakinolid ile F-aktin Stabilizasyonu Uygulanan Endotel Hücrelerinde Difteri Toksini Trafiği**  
*F-actin Stabilization by Jasplakinolide in Endothelial Cells and Diphtheria Toxin Traffic*  
Bilge ÖZERMAN EDİS, Ebru HACIOSMANOĞLU, Başak VAROL,  
Muhammet BEKTAŞ ..... **167-172**
- ***Exophiala dermatitidis* ve *Exophiala phaeomuriformis* Kökenlerinin Malaşit Yeşili Renksizleştirme Aktivitelerinin Değerlendirilmesi**  
*Evaluation of Malachite Green Decolorizing Activity of *Exophiala dermatitidis* and *Exophiala phaeomuriformis* Strains*  
Mustafa ŞENGÜL, Çağrı ERGİN, Engin KAPLAN, Level AKSOY, Macit İLKİT,  
G. Sybren de HOOG ..... **173-179**
- **İnsülin, Norepinefrin ve Östrodiolün Çeşitli Mikroorganizmaların Üremesi Üzere Etkisi**  
*Effects of Insulin, Norepinephrine and Estradiol on Growth of Different Microorganisms*  
Defne GÜMÜŞ, Fatma KALAYCI YÜKSEK, Gülşen UZ, Merve BİLGİN,  
Mine ANĞ KÜÇÜKER ..... **180-186**



- ***Giardia intestinalis* Genotiplerinin, Real-Time PCR Yöntemi ile Dışkı Örneklerinden Tespiti**  
*Determination of Giardia intestinalis Genotypes in Stool Specimens by Real-Time PCR Method*  
Mehmet DEMİRCİ, Akın YİĞİT, Cemil DEMİR, Düriye Pelin ACEL ..... **187-191**
  
- **Giresun İlinde İzole Edilen Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecium* Klinik İzolatlarının Moleküler Özellikleri**  
*Molecular Characterization of Vancomycin Resistant Enterococcus faecium Isolates from Giresun City*  
Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT, Şule KIRCA, Selma KELEŞ ULUDAĞ, Gökçen DİNÇ, Alper ÇİFTÇİ ..... **192-198**
  
- **Sivas Bölgesi'nde Servikal Örneklerde *Human papillomavirus* Sıklığı ve Genotip Dağılımı**  
*The Frequency and Genotype Distribution of Human Papillomavirus in Cervical Specimens in Sivas Region*  
Mürşit HASBEK, Cem ÇELİK, Aslı ÇABUK, Mustafa Zahir BAKICI ..... **199-204**
  
- **Dört Yıllık Süreçte Bir Üniversite Hastanesindeki Tüberküloz Dışı Mikobakterilere Ait İzlem**  
*The surveillance of Non-Tuberculous Mycobacteria in a Four Year Period at a University Hospital*  
Müge Hacer ÖZKARATAŞ, Nuran ESEN, Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK ..... **205-210**
  
- YAZARLARA BİLGİ ..... **V-VI**

# Aspergillus fumigatus Kompleksi: Zorlu Bir Patojende Yeni Bir Sorun, Azol Direnci

Dolunay GÜLMEZ <sup>®</sup>

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

## ÖZ

*Aspergillus* doğada yaygın bulunan, çoğunda bağışıklık sistemi baskılanmış olan büyük bir hasta grubunu etkileyen ve farklı hastalık tablolarına neden olabilen bir küf mantarıdır. Aspergilloz tanısı, hastalığın ve konağın karmaşık özelliklerinden dolayı hâlâ zordur. Konvansiyonel tanı yöntemlerinin duyarlılığı düşüktür, serolojik testlerin kullanımı bazı hasta alt gruplarıyla sınırlıdır ve moleküler yöntemlerin de hâlen validasyonunun tamamlanmış olması ve standart hâle getirilmesi gerekmektedir. Tedavi çoğunlukla antifungallere dayanmaktadır ve önerilen ilk basamak tedavi azollerdir. Bu nedenle, ortaya çıkan azol direnci aspergilloz olgularının sonucu üzerinde doğrudan etkiye sahiptir. Ayrıca, azoller aspergilloz için tek oral tedavi seçeneğidir ve diğer seçeneklerin maliyeti daha yüksektir. Azol dirençli *Aspergillus* etken olduğunda, invaziv aspergillozda mortalite oranları ve kronik pulmoner aspergillozda cerrahi gereksinimi artmaktadır. Azol direncinin daha az tahmin edilen bir sonucu da, tanı üzerine olmuştur. Kesin etkeni doğrulamak için kültür yöntemlerine hâlâ gereksinim olduğu için, atipik dirençli fenotipler söz konusu olduğunda kültürün duyarlılığının azalma olasılığı kaygı vericidir.

Bu derleme, *Aspergillus* ve aspergilloz ile ilgili güncel bilgileri özetlemeyi ve zaten zorlu olan bir patojende yeni güçlüklerin ortaya çıkmasına neden olan azol direncine dikkat çekmeyi amaçlamaktadır. En yaygın insan patojeni olduğundan elde edilen verilerin çoğu *Aspergillus fumigatus* kompleksi ile ilişkilidir.

**Anahtar kelimeler:** *Aspergillus fumigatus*, Aspergilloz, azol direnci

## ABSTRACT

### *Aspergillus fumigatus* Complex: A New Problem in a Challenging Pathogen, Azole Resistance

*Aspergillus* is widespread in nature and this mold may cause different clinical forms of disease that affect a large group of patients, mostly immunosuppressed patients. Diagnosis of aspergillosis is still challenging due to complex characteristics of the disease and the host. Sensitivity of conventional diagnostic methods is low, use of serological tests is limited to certain patient subpopulations and molecular methods are yet to be validated and standardized. Treatment mostly depends on the use of antifungals and, recommended first line therapy is azoles. Therefore, emerging azole resistance has a direct impact on outcome of aspergillosis cases. Furthermore, azoles are the only oral therapeutic options for aspergillosis and the cost of alternative treatment options are higher. Mortality rates in invasive aspergillosis and the need for surgery in chronic pulmonary aspergillosis increase, if caused by azole resistant *Aspergillus*. A less predicted consequence of azole resistance was the effect on diagnosis. Because culture methods are still needed to confirm the exact causative agent, possibility of decreased sensitivity of culture in case of atypical resistant phenotypes are of concern.

This review aims to summarize current information on *Aspergillus* and aspergillosis and, to draw attention to azole resistance that causes new challenges in an already complex pathogen. As it is the most widespread human pathogen, most of the data available are related to *Aspergillus fumigatus* complex.

**Keywords:** *Aspergillus fumigatus*, aspergillosis, azole resistance

## GİRİŞ

*Aspergillus*; bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara, bağışıklık sistemi sağlıklı kişilerde kronik enfeksiyonlara ve hipersensitivite reaksiyonlarına

na eğilimli kişilerde alerjik reaksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir patojendir. İnvaziv aspergillozun (İA) ölümcül sonuçları, diğer klinik formların gözden kaçabilmesine neden olmuş ve aspergillozun sınırlı bir hasta grubunu etkilediğini düşündürmüştür. Bu durum; kistik fibrozis

Alındığı tarih: 29.03.2018

Kabul tarihi: 11.05.2018

Yazarın ORCID bilgileri:

Dolunay Gülmez 0000-0001-9021-0439

(KF) ve alerjik hastalıklarda aspergilloma, sinüzit, kolonizasyon/enfeksiyon gibi kronik klinik durumlardan etkilenen yüksek sayıda hasta nedeniyle yanlış bir algıdır<sup>(1-3)</sup>. Örneğin, pulmoner tüberkülozun bir sekeli olarak dünyada bir milyondan fazla insanda kronik pulmoner aspergilloz (“chronic pulmonary aspergillosis”, CPA) bulunduğu düşünülmektedir<sup>(2)</sup>. Tüm dünyada alerjik bronkopulmoner aspergilloz (“allergic broncopulmonary aspergillosis”, ABPA) prevalansının 4.8 milyonun üzerinde olduğu ve CPA ile komplike ABPA’nın 400.000 hastaya ulaşabileceği sanılmaktadır<sup>(3)</sup>. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2013 yılında Avrupa bölgesindeki aspergilloz yükünü şu şekilde hesaplamıştır: ABPA 900.000 hasta, fungal duyarlılaşma ile giden ciddi astım (“severe asthma with fungal sensitization”, SAFS) >1 milyon hasta, CPA 240.000 hasta ve İA 63.000 hasta<sup>(4)</sup>. Bu durum, *Aspergillus* ilişkili sağlık sorunlarının sanıldığı kadar ender olmadığını göstermektedir.

Serolojik ve moleküler tekniklerdeki tüm gelişmelere karşın *Aspergillus*’un neden olduğu klinik tabloların tanısı hâlen sorun teşkil etmektedir<sup>(4-6)</sup>. Tanıda, hastanın klinik değerlendirilmesi ve bunun sonucunda aspergillozdan şüphelenilmesi temeldir. Geleneksel olarak, tanı için etkeni gösterebilen direkt mikroskopiden, etkeni üretebilen kültür yöntemlerinden ve enfeksiyon varlığını gösterebilen görüntüleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Konvansiyonel tanı yöntemlerine ek olarak yüksek riskli hasta popülasyonlarında serolojik testler önerilen edilirken, moleküler testler de geliştirilmeye devam edilmektedir<sup>(6,7)</sup>.

*Aspergillus*’un neden olduğu veya eklendiği hastalık tablolarında tedavi de güçleşmektedir. CPA olan hastalarda antifungal tedaviye ek olarak cerrahi gerekebilmekte ve hastaneye yatış sonrasında olgu ölüm hızları %20-30’lara ulaşabilmektedir<sup>(2)</sup>. İA olgularında mortalite

%50’nin üzerindedir ve kemik iliği nakli yapılan hastalarda en uygun antifungal terapi uygulansa bile daha yüksek olabilmektedir<sup>(4,8)</sup>. Altta yatan hastalıklar ve enfeksiyon bölgesi ana prognostik etkenler olsa da, son on yılda İA mortalitesinde azalma gözlenmiş ve bu durum, diğer faktörlerin yanı sıra azol tedavisine bağlanmıştır<sup>(7-9)</sup>. Azol tedavisi ile elde edilen bu avantaj, *Aspergillus*’ta ortaya çıkan azol direnci nedeniyle kaybedilme tehdidi altındadır. Azol grubu, farklı aspergilloz klinik tabloları için ilk tedavi seçeneği olarak önerilmektedir ve başka oral tedavi seçeneği bulunmamaktadır<sup>(6,9)</sup>. Amfoterisin B’nin lipid formülasyonları ve ekinokandinleri de içeren diğer tedavi seçenekleri fataliteyi önlemede azoller kadar etkili olamamaktadır<sup>(4,6,8)</sup>.

Beklendiği gibi, ortaya çıkan azol direnci aspergillozun tedavisini zorlaştırmaktadır ve azole dirençli aspergilloz mortalite oranları endişe vericidir<sup>(1,4,10)</sup>. Azol dirençli suşlar etken olduğunda, İA’da mortalite %88’e ulaşabilmekte<sup>(11)</sup> ve CPA’da tedavi başarısızlığı artmaktadır<sup>(4,12)</sup>. Azol direncinin daha az tahmin edilebilir bir sonucu da, etkeni kesinleştirmek için hâlen konvansiyonel kültür yöntemlerine dayanan aspergilloz tanısı üzerinde olmuştur<sup>(6,10)</sup>. Aspergillozda kültür duyarlılığı düşüktür ve zor üreyen ve/veya az sporlanan, atipik dirençli fenotiplerin ortaya çıkışı durumu daha karmaşık hâle getirmiştir<sup>(10,13)</sup>.

Bu derleme, *Aspergillus* ve aspergilloz ile ilgili yeni gelişmeleri özetlemeyi ve yeni bir sorun olan azol direncine dikkati çekmeyi amaçlamaktadır. Çalışma, en yaygın insan patojeni olduğundan daha kapsamlı olarak çalışılan *Aspergillus fumigatus* kompleksine odaklanmıştır.

### Bir küf mantarı olarak *Aspergillus*

*Aspergillus*, birçok farklı habitatta bulunabilen saprofitik, filamentöz bir mantardır. Tüm türlerde septalı hifler ve üzerinde konidyum oluşturan

fialidlerin bulunduğu tipik vezikül yapısı ortak-  
tır. Koloninin dokusu kadifemsi, pamuksu veya  
yünsü olabilmektedir. Koloni ön yüzünün rengi  
türe göre değişmekte ve yeşil, sarı, turuncu, kah-  
verengi veya siyah tonlarında görünebilmekte-  
dir<sup>(14-16)</sup>. *A. fumigatus* kompleksine ait kolonile-  
rin rengi farklı yeşil tonlarında olabilmekte ve  
sporulasyondan etkilenmektedir<sup>(10,14)</sup>.

*Aspergillus* seksüel, aseksüel veya paraseksüel  
yolla üreyebilmektedir. Aseksüel üreme sırasın-  
da bol miktarda konidyum üretildiği için, genetik  
değişiklik geçirme fırsatı artmaktadır. Askospor oluşumu ile karakterize olan seksüel  
üreme, iki ayrı suşa ait genetik materyali birleş-  
tirme avantajına sahiptir. Paraseksüel üremede  
ise iki uyumlu suşa ait hifler kaynaşmaktadır. Bu  
durum, küf mantarının sporulasyon olmadan  
genetik madde aktarmasına olanak tanımaktadır  
ve olgun bir miçelyumda, biyofilmde ve in vivo  
olarak ortaya çıkabilmesi nedeniyle önemli-  
dir<sup>(10,16)</sup>. Farklı üreme yolları, mantarın genetik  
değişimler geçirmesini ve antifungal direnç  
mutasyonları geliştirmek de dahil olmak üzere  
çevreye uyum sağlayabilmesini sağlamakta-  
dır<sup>(10)</sup>.

*Aspergillus* cinsi içinde yaklaşık 180 tür tanımlanmış olmakla birlikte, bu türlerin hepsi insan-  
da hastalık etkeni olarak bildirilmemiştir<sup>(14,16)</sup>. En sık görülen insan patojeni *A. fumigatus* iken, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus* gibi diğer bazı türler de insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyona neden olabilmektedirler<sup>(14-16)</sup>. *Aspergillus*'un tür düzeyinde tanımlanması, türlerin farklı direnç paternleri nedeniyle klinik olarak önemli olabilmektedir. Çoğu rutin laboratuvar, küf mantarlarının tanımlanması için makroskopik ve mikroskopik morfolojik özellikleri kullanmaktadır. Bu nedenle, çoğu klinik izolat tür kompleksi düzeyinde tanımlanmaktadır<sup>(7)</sup>. Klinik bir laboratuvar, örnekten izole edilerek morfolojik özelliklerine göre tanımlanan bir suş "*Aspergillus fumigatus*

kompleksi" ("*Aspergillus* section Fumigati") olarak rapor edilebilmektedir. Bu durumda, ilgili suş *A. fumigatus* sensu stricto ya da azole intrinsik direnç gösterebilen ilişkili başka bir kriptik tür olabilmektedir. Triazol direnci *A. fumigatus* sensu stricto için ender olmasına rağmen, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus viridinutans* ve *Aspergillus thermomutatus* (*Neosartorya pseudofischeri*) vd. türler dirençli olabilmekte ve tedavisi güç enfeksiyonlardan sorumlu olabilmektedirler<sup>(17)</sup>. Bu türlerin ayırıcı tanısı için DNA dizileme yöntemleri gerekli olabilmektedir. Mikroorganizma molekül içeriğini inceleyerek tanımlama yapan MALDITOF-MS ("Matriks assisted laser desorption ionization time of flight-mass spectrometry") gibi yöntemler ile elde edilen sonuçlar da umut vericidir<sup>(17)</sup>.

### ***Aspergillus* hastalıkları ve tanısı**

*Aspergillus* türleri, konağın özelliklerine bağlı olarak çok farklı hastalık tablolarına neden olabilirler. Üç ana form, invaziv aspergilloz (İA), kronik ve/veya saprofitik aspergilloz ve alerjik aspergilloz olarak tanımlanabilmektedir<sup>(6)</sup>. Bu formlar çok çeşitli klinik tutulumlar ile seyredildiğinden, tanı için klinik bulgular, mikrobiyolojik veriler ve görüntüleme tekniklerinin birlikte kullanılması ve öncelikle etkilenen vücut bölgelerinin incelenmesi esastır. Konvansiyonel olarak doğrudan mikroskopi (Gram-boyama gibi nonspesifik yöntemlerin yanı sıra mantarların gösterilmesinde daha başarılı olan kalkoflor beyazı, Gomori'nin metenamin gümüşleme yönetemi, Periodic Acid Schiff (PAS) gibi yöntemler), kültür yöntemleri ve görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır<sup>(6,7)</sup>. Serolojik testler (galaktomannan ve  $\beta$ -D-glukan) tanıda yardımcı olabilmektedir. Moleküler testler umut verici olmakla birlikte, diğer tanısal testlerle birlikte kullanımı önerilmektedir<sup>(6,7)</sup>. Mantar enfeksiyonu varlığından emin olmak için mikrobiyolojik ve/veya histopatolojik testler ile mantarın göster-

rilmesi istenmektedir. Etkenin kesin olarak belirlenebilmesi ve tanımlanabilmesi için kültürde üretilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, etken mantarın adının konması, düşük kültür duyarlılığından etkilenmektedir<sup>(6,15,17)</sup>. Ayrıca, balgam gibi steril olmayan bir vücut bölgesinde saptanan bir *Aspergillus* pozitif kültür, mantarın doğada yaygın olarak bulunması ve solunum yollarında kolonize olabilmesi nedeniyle enfeksiyon varlığına kesin kanıt olarak görülmemektedir. Steril vücut bölgelerinden alınan örnekler daha invaziv prosedürler gerektirirler ancak daha fazla tanısal değere sahiptirler<sup>(5,6)</sup>. Aspergilloz tanı ve tedavisi için Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin (Infectious Diseases Society of America, IDSA) kılavuzu ve Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) Şubat 2018'de yenilenen kılavuzu her hastanın bireysel olarak değerlendirilmesi gereğini vurgulamaktadır<sup>(6,7)</sup>.

Hematolojik malignitesi, kök hücre nakli, solid organ nakli, CD4 hücre sayısı <50 hücre/ $\mu$ L olan AIDS hastaları veya kortikosteroidler gibi bağışıklık sistemini baskılayan tedaviler alan hastalarda, *Aspergillus* konidyumları çimlenerek dokuları invaze eden hifler oluşturabilmektedirler<sup>(16)</sup>. İnfektif konidyumlar genellikle inhalasyon yoluyla alındığından, İA en sık olarak akciğerleri tutmaktadır. Ancak, diğer organlar veya sinüsler de etkilenebilmekte veya bağışıklık sisteminde ciddi baskılanma olanlarda dissemine İA gelişebilmektedir<sup>(15)</sup>.

İA tanısı için doku ve vücut sıvılarının eşzamanlı mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemesi önerilmektedir<sup>(6,7)</sup>. Örnekler, enfeksiyon bölgesinden alınmalıdır. Ancak, doğru örneğin yeterli miktarda temin edilmesi, stabil olmayan hastalarda gerçekleştirilmesi olası olmayan invaziv işlemler gerektirebilmektedir. Örneğin, trombotopenik bir hastada bronkoalveolar lavaj (BAL)

veya akciğer dokusu alınması işlemlerinden, olası ciddi komplikasyonlar nedeniyle uzak durulabilmektedir<sup>(7)</sup>. Ayrıca, histopatolojik incelemede dikotom dallanma gösteren septalı hifler görülmesi *Aspergillus*'a özgül değildir ve diğer hiyalen küf enfeksiyonlarında da gözlenebilmektedir<sup>(14-16)</sup>. Akciğer tutulumu şüphesinde yüksek çözünürlüklü akciğer tomografisi de kesinlikle önerilmektedir<sup>(6,7)</sup>.

İA tanısında serolojik testler de yardımcı olabilmektedir. Serum ve/veya BAL galaktomannan düzeylerinin saptanması, özellikle hematolojik malignitesi olanlar gibi belirli bazı hasta gruplarında önerilmektedir<sup>(6,7,15)</sup>. *Aspergilloz* için özgül olmamakla birlikte, serum 1,3- $\beta$ -d-glukan testi de yüksek riskli hastalarda yararlı olabilmektedir<sup>(6,7)</sup>. IDSA, 2016 yılı kılavuzunda, kanda polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ile *Aspergillus* tanısının gelecek vadettiğini ancak ticari testlerin henüz standardizasyon ve validasyonunun yeterli olmadığını belirtmiştir<sup>(6)</sup>. IDSA, bu durumda PCR temelli testlerin klinik değerlendirme ve diğer tanısal testlerin sonuçları ile birlikte değerlendirilmesini önermiştir. ESCMID'in 2018'de yenilenen kılavuzu da kan ve BAL örneklerinde uygulanan PCR temelli testlerin diğer tanısal testler ile birlikte kullanımının daha özgül ve erken tanı için yardımcı olabildiğini belirtmiştir<sup>(7)</sup>. PCR, doğrudan enfeksiyon bölgesinden alınan doku, beyin omurilik sıvısı vb. örneklerde de uygulanabilmektedir. Moleküler testler, histopatolojik olarak hif görülen dokularda küfün tanımlanması için, hif görülmemiş örneklerde de aspergilloz tanısı için kullanılabilir. Ancak, örneğin alınmasının zorluğu ve testin standardizasyonu/validasyonu ile ilgili sorunlar burada da henüz devam etmektedir<sup>(6,7)</sup>.

Kronik pulmoner aspergilloz (CPA) farklı solunum yolu hastalıklarını komplike edebilen ender bir hastalıktır. Tanı ve tedavisi üzerinde çalışan bir ESCMID görev ekibi bulunmaktadır<sup>(5)</sup>. CPA'nın en sık görülen formu olan kronik kavi-

ter pulmoner aspergilloz (“chronic cavitary pulmonary aspergilosis”, CCPA), tedavi edilmezse kronik fibrozan pulmoner aspergilloza ilerleyebilmektedir<sup>(5,6)</sup>. Daha az görülen klinik tablolar arasında aspergillus nodülü ve tek aspergilloma bulunmaktadır. Tüm bu klinik tablolar bağışıklık sistemi bozulmamış, geçmişte veya eşzamanlı akciğer hastalığı olan kişilerde gözlenebilmekte ve bir hastada farklı tablolar birlikte görülebilmektedir<sup>(5,6)</sup>. CPA tanısı, akciğer görüntüleme tetkiklerinde >3 ay devam eden lezyon görüntüleri, *Aspergillus* enfeksiyonu kanıtı (doğrudan mikroskopi, kültür veya antijen pozitifliği) ve diğer olası tanıların dışlanması ile konabilmektedir<sup>(5,6)</sup>. *Aspergillus* varlığının kanıtlanmasında moleküler yöntemler kültüre göre daha duyarlıdır ve güçlü PCR sinyalleri, enfeksiyon ve artmış fungal yük ile korelasyon göstermektedir<sup>(5)</sup>.

Hastanın bağışıklık sisteminde baskılanma gelişen durumlarda, kronik hastalık formlarında invazyon görülebilmektedir. Subakut invaziv pulmoner aspergilloz (önceki adı kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz) veya invaziv fungal sinüzit bağışıklık sisteminde orta derecede baskılanma olan hastalarda ortaya çıkabilen progresif enfeksiyonlara örnek gösterilebilirler. Bu hastalıkların İA gibi ele alınması gerekmektedir<sup>(5,6)</sup>.

Lokalize noninvaziv kolonizasyon nazal sinüslerde, dış kulak kanalında, kornea ve tırnaklarda görülebilmektedir<sup>(6,16)</sup>. Trakeobronşiyal aspergillozun (TBA) saprofitik formları da olabilmekte ve semptomatik veya bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar dışında tedavi gerekmemektedir<sup>(6)</sup>.

*Aspergillus* kolonizasyonu, alerjik hastalık ve enfeksiyon ayrımı özellikle kronik akciğer hastalığı olanlarda güçleşmektedir. Bunların arasında, KF oldukça gündemdedir. Hava yolu mukus koyulaşması, siliyer işlev bozukluğu ve bronşektazi gibi uzun süreli hasarlar mikroorganiz-

maların ortamda kalıcı olmasına neden olmakta, steroid inhalasyonu ve antibiyotik kullanımı da mantarlara avantaj sağlamaktadır. Ancak, alevlenme sırasında saptanan pozitif bir kültür, hastalık etkenini belirleyebileceği gibi yalnızca kolonizasyona da işaret edebilmektedir.

KF hastalarında fungal enfeksiyon tanısı; artmış balgam üretimi, aynı mantarın birden fazla kez kültürde üretilmesi, radyolojik bulgular, antibiyotik tedavisi ile başarısızlık ve akciğer fonksiyonlarında açıklanamayan azalma görülmesi durumunda konabilmektedir. Ayrıca, atipik mikobakteriler gibi yeni bakteriyel etkenlerin ve ABPA’nın ekarte edilmesi de gerekmektedir<sup>(18)</sup>. KF’deki enfeksiyonun kronik polimikrobiyal doğasından ötürü, mantarların patogenezdaki rolünün kanıtlanması zorlaşmaktadır. Yine de, mantar izolasyonunun hastalığa katkısını gösteren kanıtlar gittikçe artmaktadır<sup>(6,18-20)</sup>.

Hipersensitivite reaksiyonlarına eğilimi olan kişilerde *Aspergillus* konidyumlarının yüzey antijenlerine karşı alerjik reaksiyonlar ortaya çıkabilir. Bu durum, antijenlere maruziyet sonrasında ya da mantarın bronşiyal ağaç veya sinüsler gibi bir vücut bölgesinde kolonizasyon sonucu gelişebilmektedir<sup>(16)</sup>.

Alerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA), alerjik reaksiyonun bronşiyal ağaç kolonizasyonu sonrası tetiklenmesi ile ortaya çıkan bir tablodur<sup>(16)</sup>. Genellikle, astım veya KF gibi, altta yatan akciğer hastalığı olan kişiler etkilenmektedir<sup>(6)</sup>. *Aspergillus* immünoglobulin E (IgE) ve total IgE’de yükselme tipiktir. Alerjik fungal rinosinüzit de görülebilmektedir. Tanı için nazal polipozisin gösterilmesi ve koyu eozinofilik müsin içeren mukus içinde hif yapılarının gözlenmesi ve *Aspergillus* IgE için serum antikoru veya deri delme (“prick”) testi pozitifliği gerekmektedir<sup>(6)</sup>. Fungal duyarlılaşma ile giden ciddi astım (“severe asthma with fungal sensitization”, SAFS) konidyumlara maruziyet sonrasında



da astımı olan bazı hastalarda gelişebilmektedir<sup>(4)</sup>.

### Aspergillozun antifungal tedavisi

*Aspergillus* enfeksiyonlarında antifungal ajanlar ile tedavi zorunludur ve birincil tedavi olarak küf aktif azoller önerilmektedir. İA gibi prognozunda bağışıklık sistemi işlevinin kritik olduğu klinik tablolarda bile, bağışıklık sistemini düzenleyici yöntemler destek tedavi olarak düşünülmektedir. Cerrahi yalnızca lokal enfeksiyonlarda yararlı olabilmektedir. Bu nedenle uygun antifungal tedavi terapötik yaklaşımların temelini oluşturmakta, ilaç dozlarının yeterliliğinin takibi için monitorizasyon önerileri de bulunmaktadır<sup>(6,7)</sup>. IDSA, İA olgularında ilk tedavi seçeneği olarak vorikonazol, CPA olgularında ise itrakonazol veya vorikonazol önermektedir<sup>(6)</sup>. Diğer iki seçenek olan amfoterisin B'nin lipid formülasyonları ve ekinokandinlerin intravenöz olarak verilmesi gerekmektedir. Kaynakların kısıtlı olduğu merkezlerde ve azollerin kontraendike olduğu veya tolere edilemediği durumlarda, amfoterisin B deoksikolat kullanılabilmekteyse de yüksek toksisitesi nedeniyle, öncelikle lipidli formülasyonların uygun olduğu da belirtilmiştir<sup>(6)</sup>. Yenilenen ESCMID kılavuzunda ise İA tedavisinde vorikonazol veya isavukonazol önerilirken, yüksek azol minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptandığında tedavide lipidli amforisin B bileşiklerine veya kombine tedavi seçeneklerine yönelmek gerektiği bildirilmiştir<sup>(7)</sup>. Bu kılavuzda tür kompleksine ve türe göre (örneğin azollere intrinsik direnç gösteren *A. fumigatus* kompleksine ait türler için) farklı tedavi önerileri de bulunmaktadır<sup>(7)</sup>. Amfoterisin B'nin lipid formülasyonları ile tedavinin TR<sub>34</sub>/L98H vb. azol direnç mutasyonlarına sahip suşlarla geliştirilen deneysel enfeksiyon modellerinde başarılı olabildiği gösterilmiş<sup>(21)</sup>, bağışıklığı baskılanmış farelerde daha yüksek doz gerektiği bildirilmiştir<sup>(22)</sup>. Ekinokandinler ise faz II çalışmalarda düşük etkinlik gözlemlendi-

ğinden İA tedavisinde ilk tedavi olarak önerilmemekte, ancak kurtarma tedavisi olarak kullanılabilecekleri belirtilmektedir<sup>(4,6)</sup>. Örneğin, azol dirençli suşlarla geliştirilen fare enfeksiyon modelinde anidulafungin doza bağlı olarak artan bir etkinlik göstermiş ama maksimum sağkalım yanıtı oluşturamamıştır<sup>(23)</sup>. Azol ve ekinokandin kombinasyonları yarar sağlamamaktadır. Amfoterisin B ve ekinokandin kombinasyonlarının ise maliyeti yüksektir<sup>(4,24)</sup>. Alerjik aspergilloz tablolarında, KF hastasında akciğer fonksiyonlarında kötüleşme veya alerjik fungal rinosinüziti olan bir hastada tedaviye dirençli/yineleyen hastalık gözlenmesi gibi tablonun enfeksiyona ilerlediği şüphesi yoksa antifungal tedavi önerilmemektedir<sup>(6)</sup>.

*Aspergilloz* tedavisi, azole dirençli *Aspergillus*'un etken olması durumunda daha ciddi bir sorun hâline gelmektedir. Merkezi sinir sistemi aspergillozu, yüksek mortaliteye sahip ve yıkıcı bir hastalıktır<sup>(6)</sup>. İlk tedavi seçeneği olarak önerilen vorikonazol ile bildirilen başarı oranları bile %35 gibi düşük oranlarda seyretmekte, lipozomal amfoterisin B ile %10'a, amfoterisin B deoksikolat ile ise %1'lere düşebilmektedir<sup>(6,8,25)</sup>. Ayrıca, kronik aspergillozlarda elimizdeki tek oral tedavi seçeneği azollerdir<sup>(1,4,6)</sup>.

İA tedavisinde bağışıklık sistemini baskılayan ajanların azaltılması veya kesilmesi önerilmektedir. Ek olarak, koloni uyarıcı faktörlerin verilmesi veya devam eden tedaviye granülosit transfüzyonları eklenmesi gibi bağışıklık sistemini düzenleyici uygulamalar da kullanılabilmektedir<sup>(6,7)</sup>. Ancak, hastaların bu uygulamalara verdikleri yanıtlar değişken olabilmektedir. Tedavi veya koruma amaçlı aşı çalışmaları da bulunmaktadır. Yüksek İA riski olan ve ölümcül sonuçlarla karşılaşabilecek hastalarda veya uzun süreli antifungal tedavi gereksinimi nedeniyle direnç gelişimine açık olan CPA hastalarında kullanılabilecekleri düşünülmektedir<sup>(26)</sup>. Bu çalışmaların değerlendirilebilmesi için kriterler

henüz net değildir. Mortalitede azalma, aspergilloz gelişmeden geçirilen sağkalım süresi, fungus eradikasyonu, kolonizasyondan veya enfeksiyondan korunma gibi farklı değişkenler ölçülebilecek ve her biri için farklı sonuçlar elde edilecektir. Patojen *Aspergillus* türlerine ait epitopların ve özelliklerinin ayrıntılarıyla tanımlanması gerekecektir. Ancak bu değişkenler belirlendikten sonra bir aşı çalışmasının tasarlanması, uygulanması ve başarısının saptanabilmesi olası olacaktır<sup>(26)</sup>.

*Aspergilloz* tedavisindeki bu sınırlayıcı etkenler göz önüne alındığında, ortaya çıkan ve yayılma eğiliminde olan *Aspergillus*'ta azol direnci oldukça düşündürücü bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

### ***Aspergillus*'ta azol direnci**

Bir mikroorganizmanın uzun süre seçici antimikrobiyal baskısı altında kalması durumunda direnç gelişebilmektedir. Bu durum, azole dirençli *Aspergillus* için de tetikleyici gibi görünmektedir. *Aspergillus* suşları çevresel ve nozokomiyal ortamlarda azollere maruz kalmaktadırlar. Azoller tarımda fungusit olarak kullanılmaktadır ve kronik hastalıkları veya alerjik rahatsızlıkları olan hastalar için mantarın eradikasyonu gerçekleşmeden uzun süreli azol tedavisi gerekmektedir<sup>(1,10)</sup>.

Klinik *A. fumigatus* izolatlarında azol direnci, yalnızca amfoterisin B ve itraconazolün İA tedavisinde lisanslı olduğu 1989 yılına ait izolatlarda bile bildirilmiştir<sup>(27)</sup>. Bildirilen itraconazole dirençli iki izolat, iki farklı hastadan birincil olarak elde edilmiş ve genetik olarak ilişkili bulunmamışlardır. Ayrıca, yüksek MİK değerlerinin hayvan modelinde in vivo tedavi başarısızlığı ile uyumlu olduğu gösterilmiş; izolatların birinde düşük hücre içi itraconazol seviyeleri gözlenmesi, diğerinde ise ergosterol sentez inhibisyonu için daha yüksek hücre içi düzeylerin

gerekmesi nedeniyle iki farklı direnç mekanizmasının sorumlu olması gerektiği ortaya çıkmıştır. Bu çalışma, aspergillozun ilk basamak tedavisi olarak azollerin rolünün garanti olmadığının ilk belirtisidir.

Sonraki 10 yıl içinde azol dirençli *Aspergillus* izolatları sporadik olarak bildirilmekle birlikte, 2007'den sonra artmış, farklı merkezler ve coğrafi bölgelerden değişken direnç oranları bildirilmeye başlanmıştır<sup>(1,4)</sup>. ARTEMIS global süreyans çalışmasında, İA etkeni olan *A. fumigatus* izolatlarında azol direnç oranı (itraconazol, vorikonazol veya posakonazol) %5.8 (29/497) olarak bulunmuş ve tüm dirençli izolatların Çin'de izole edildikleri belirtilmiştir<sup>(28)</sup>. Hollanda'da klinik *A. fumigatus* izolatlarında Haziran 2007-Ocak 2009 arasında %5.3 direnç gözlenmiştir<sup>(11)</sup>. Dikkati çeken diğer bir nokta, birden fazla azolün dirençten etkilenebilmesidir<sup>(4,11,28)</sup>.

*Aspergillus fumigatus* triazol MİK değerleri çoğunlukla 14-alfa-demetilazı kodlayan *cyp51A* genindeki mutasyonlara bağlı olarak yükselmektedir. Atım pompalarının aşırı ekspresyonu veya membran geçirgenliğinde azalma gibi azollerin hücre içi birikimini azaltan diğer direnç mekanizmaları da sorumlu olabilmektedir<sup>(27-30)</sup>. İki farklı direnç eğilimi fark edilmiştir. İngiltere ve İspanya'dan bildirilen çalışmalarda, uzun dönem azol tedavisinden sonra, özellikle kodon 54 ve 220'de *cyp51A* mutasyonları saptanırken; Hollanda'dan bildirilenlerde ise azole maruz kalmış ve kalmamış hastalardan elde edilenlerin yanı sıra, doğadan izole edilen suşlardan söz edilmiştir<sup>(4,11,12,31-35)</sup>. Bu çevresel izolatlardaki azol direncinde, 34-bp "tandem repeat" ve *cyp51A* geninin 98. kodonunda bir nokta mutasyonu (TR<sub>34</sub>/L98H) ile karakterize spesifik bir patern dikkat çekmiştir. Sonraki çalışmalarda her iki tip mutasyonun da hem klinik hem de çevresel izolatlarda varlıkları gösterilmişse de, *Aspergillus* azol direncinin iki farklı şekilde gelişebileceği düşünülmektedir<sup>(4,9,36)</sup>. Birincisi,



uzun süreli azol tedavisi veya profilaksisinin *Aspergillus* azol MİK değerlerinde yükselmeye ve sonrasında direnç gelişimine neden olmasıdır<sup>(4,9,12,32)</sup>. Bu durumda dirençli fenotip, azol baskısı altındaki hastada hayatta kalmaya çalışan *A. fumigatus*'un geçirdiği genellikle tek bir mutasyon ile ortaya çıkmaktadır. Hastada daha önce saptanan duyarlı fenotip ile aynı genotipte olduğu, onun devamı olduğu gösterilebilmektedir<sup>(4,9,31)</sup>. Bu durumda mutasyonlar çok çeşitli olabilmektedir<sup>(4)</sup>. İkincisinde ise azollere doğadaki maruziyet direnç gelişimine neden olarak suçlanmaktadır<sup>(4,9)</sup>. Bu durumda, dirençli izolatlarda karakteristik bir grup mutasyon görülmektedir ve öncelikle çevreden köken alır gibi görünseler de hastane ortamına da yayılmaktadırlar<sup>(4,9)</sup>. Bu izolatların tarım ve bahçecilikte kullanılan sterol demetilasyon inhibitörü antifungaller ile ilişkili oldukları düşünülmektedir<sup>(4)</sup>. Tarımda kullanılan antifungallerin çoğu triazol türevidir ve *Aspergillus* dâhil saprofitik küfler üzerinde seçici baskıya neden olmaktadır. Seksüel and paraseksüel üreme, direnç genlerinin yayılımını artırabilmektedir<sup>(4)</sup>. Bu gruptaki baskın direnç mekanizması, ilk olarak Hollanda'da saptanan TR<sub>34</sub>/L98H mutasyonudur<sup>(4,37)</sup>. Hollanda'da 1990-1996 yılları arasında beş farklı azol bileşiğinin tarımsal kullanımı onaylanmış ve ilk klinik TR<sub>34</sub>/L98H mutanlığı 1998'de izole edilmiştir. Azol direncine neden olan "tandem repeat" dizileri fitopatogenik funguslarda da bulunmuştur. Ayrıca L98H mutasyonunun tıbbi azol benzeri yapıdaki tarımsal azolleri inhibe ettiği gösterilmiştir. TR<sub>34</sub>/L98H mutasyonu, azole maruz kalmamış hastalardan izole edilen izolatlarda da saptanmıştır. Bu durum, aspergillozda hastadan hastaya bulaş beklenmediğinden, dirençli konidyumların çevreden kazanılması ile açıklanmıştır. Tekrarlayan *A. fumigatus* kültür pozitifliği saptanan hastalarda TR<sub>34</sub>/L98H pozitif suşlardan önce izole edilmiş bir izojenik duyarlı fenotip bulunmaması da, bu dirençli fenotipin dışarıdan kazanıldığı varsayımını desteklemektedir<sup>(4)</sup>.

Doğada ortaya çıktığı düşünülen TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A gibi başka mutasyonlar ve *Cyp51A* geni dışında mutasyonlar da bildirilmiştir<sup>(4,9,38)</sup>. *A. fumigatus* TR<sub>34</sub>/L98H ve TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A *cyp51A* genotiplerinin direnç fenotipleri farklı olabilmektedir. Örneğin, TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A mutantlarında itrakonazol MİK değerlerinde bimodal dağılım gözlenmekte ve daha düşük MİK değerleri gözlenen suşlar bulunmaktadır<sup>(39)</sup>.

Türkiye de dâhil olmak üzere dünyada farklı coğrafi bölgelerden hem hastada kazanılmış hem de çevresel tip mutasyonlar bildirilmiştir<sup>(4,9,36,40,41)</sup>. Hastada kazanılmış ve çevresel *Aspergillus* azol direncinin özellikleri Tablo'da özetlenmiştir. Ancak, klinik örneklerden çevresel mutasyona sahip suşların izole edilebileceği ve klinik mutantların çevreye uyum sağlayabilecekleri unutulmamalıdır<sup>(9,36,40,41)</sup>.

Azollere karşı direnç gelişiminin kontrol edilmesi, elimizdeki verilerle ulaşması zor bir amaç gibi görünmektedir. Hastada kazanılmış direnç, *Aspergillus*'un eradikasyonunun sağlanamadığı ve hastanın uzun süreli azol tedavisine maruz kaldığı kronik hastalıklar ile ilişkilidir. Ayrıca, kavite varlığında in vivo sporulasyon gerçekleşebilmekte ve bu da mantar yükünü artırarak mutasyon gelişimini kolaylaştırmaktadır<sup>(10,13)</sup>. Kronik enfeksiyonu olan hastalarda uygulanan tedavi stratejileri, direnç gelişimini önlemekte başarısız olabilmektedir<sup>(10)</sup>. İA seyri sırasında biyofilm gelişimi ve/veya sporulasyon beklenmediği ve tedavi başarısızlığı genellikle kısa sürede ölümle sonuçlandığı için, tedavi sırasında direnç gelişimi öncelikli bir sorun olarak karşımıza çıkmamaktadır<sup>(10,42)</sup>. Çevrede kazanılan direnç söz konusu olduğunda ise, suşun doğada hayatta kalabilmesi gerekmektedir. Bu nedenle direnç mutasyonlarının suşa metabolik bir maliyeti olması ve mikrobiyal formunun etkilenmesi durumunda bile, dirençli suşlar, duyarlıların yanı sıra var olabilecek şekilde uyum sağlamalıdır<sup>(4)</sup>. Bu hipotez, *cyp51A* mutasyo-

nu olan suşların form ve virülanslarının sokak suşlarına yakın olduğunu gösteren bir çalışma ile de desteklenmiştir<sup>(43)</sup>. Bu nedenle, dirençli suşların doğada kalıcı olması olası görünmektedir ve azollerin tarımda kullanımlarının kısıtlanmasının etkisi sınırlı olabilir<sup>(4)</sup>. Tüm bu etkenler göz önüne alındığında, azol direncinin ortaya çıkmasına ve yayılmasına yol açan etkenlerin kontrol edilmesi için daha çok veriye ve çabaya gerek duyulacağı öngörülmektedir.

Ayrıca, *A. fumigatus* tür kompleksi içinde *N. pseudofischeri*, *A. lentulus*, *Aspergillus calidoustus* gibi azole azalmış duyarlılık gösteren türler de bulunmaktadır. Bu kriptik türler, seçici azol baskısı altında hastalardan daha çok izole edilme eğiliminde olacaklardır<sup>(7,17)</sup>.

#### ***Aspergillus*'ta azol direncinin saptanması**

*Aspergillus*'ta azol direncinin saptanması için standart yöntem, mantarın kültürde üretilmesine dayanmaktadır. Bir örnekten saf kültür hâlinde elde edilen izolat, bir referans yöntem ile antifungal duyarlılık açısından test edilebilir. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) filamentöz mantarların antifungal duyarlılıklarının test edilebilmesi için referans yöntemler önermişlerdir. CLSI, 2008'de M38-A2 kılavuzunu yayınlamıştır. Ancak, bu belgede klinik sınır değer önerileri bulunmamaktadır<sup>(44)</sup>. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* ve *A. versicolor* için CLSI yöntemi ile elde edilen türe özgü itra-konazol, posakonazol ve vorikonazol epidemiyolojik eşik değerleri 2010 yılında tanımlanmış ve ilgili çalışma *Aspergillus* için daha önceki çalışmalarda bildirilen azol direncine dikkati çekmiştir<sup>(45)</sup>. EUCAST, küfler için önerdiği antifungal duyarlılık testi yöntemini Ocak 2017'de yenilemiştir<sup>(46)</sup>. EUCAST yönteminde, bazı tür/azol kombinasyonları için tanımlanmış türe özgü klinik sınır değerler ve epidemiyolojik eşik

değerler bulunmaktadır<sup>(47-49)</sup>.

*Aspergillus* için onaylanmış referans antifungal duyarlılık testleri bulunmakla birlikte, bu testler emek yoğunudur ve sonuçlanmaları beş güne kadar uzayabilmektedir<sup>(4)</sup>. Rutin klinik laboratuvarlarda hızlı sonuç elde edilebilmesi için bir agar tarama testi önerilmiştir<sup>(7,11,37,50)</sup>. Yöntem; üç bölmesine itra-konazol, posakonazol ve vorikonazol eklenmiş olan dört bölmeli bir RPMI1640 agar plağı içermektedir. Azol içeren bölmelerde herhangi bir üreme olması durumunda azol direncinden şüphelenilmekte ve referans mikrodilüsyon yöntemi ile doğrulama önerilmektedir.

Azol direncinin test edilmesi için önerilen referans yöntemler ve tarama testi ile ilgili başka bir sorun, etkenin saf kültürüne olan gereksinimdir. Bu durum bazı dezavantajlara neden olmaktadır: 1) Aspergillozda, özellikle CPA ve ABPA gibi, direnç gelişiminin daha olası olduğu kronik hastalıklarda kültür duyarlılığı düşüktür. 2) Etkenin saf kültürün test edilmesi, duyarlı ve dirençli fenotiplerin tek örnekte bulunduğu durumlarda yanlış yönlendirici olabilmektedir. Çok sayıda (beş koloniye kadar) farklı koloninin test edilmesi önerilmekle birlikte<sup>(7)</sup>, rutin laboratuvar iş yükünü çok artırabileceği de düşünülmektedir. 3) Hastada kazanılan direnç, etkende form kaybına neden olabilmektedir. Dirençli fenotiplerin daha küçük kolonileri, üzerlerinin daha kolay üreyen duyarlı koloniler tarafından kaplanması veya pasajlarda kolayca üretilmemeleri durumunda gözden kaçırılabilir. Sporulasyon azalmışsa, antifungal duyarlılık testinde inokulum için gerekli miktarda konidyum elde edilemeyecektir; ayrıca tanımlamanın mikroskopik ve makroskopik morfolojiye dayandığı çoğu laboratuvar da tanımlama bile sorun olacaktır. Dahası, form kaybı nedeniyle, dirençli fenotip kültürde hiç izole edilemeyecebilir<sup>(6,10,44-49)</sup>.

Kültür negatif örneklerden antifungal direncin saptanmasına yönelik standart bir yöntem bulunmamaktadır. Aspergillozun tanısı ve sonrasında etkendeki azol direncinin saptanması için moleküler yöntemlerin kullanılması, bu olgularda çözüm olabilir. *Aspergillus* tanısı için PCR geliştirilme aşamasındadır ve umut verici görünmektedir<sup>(6)</sup>. Tanıda diğer testlerle kombine kullanılabileceği düşünülmektedir<sup>(7)</sup>. *Aspergillus* DNA'sının saptanması için çok kopyalı genlerin hedeflenmesi olasıdır ve kan örneklerine ek olarak doğrudan enfeksiyon bölgesinden alınan örneklerin test edilmesi duyarlılığı artırabilecektir. Ancak, azol direncinin saptanabilmesi için

bazı ek zorlukların aşılması gerekmektedir. Mutasyonların büyük çoğunluğunun gözlemlendiği *cyp51A* geni tek kopyalı bir gendir ve bu durum daha düşük bir PCR duyarlılığına neden olabilir<sup>(4)</sup>. Bu gende çok sayıda direnç mutasyonu bulunabildiğinden, tüm mutasyonların PCR ile taranması olası olmayabilir ve *cyp51A* geninin amplifikasyonu sonrası dizileme gereksinimi olabilir. Bu durumda, saptanan mutasyonların azol direnciyle ilişkisinin gösterilmesi de gereklidir. Ayrıca *cyp51A* geni dışındaki direnç mekanizmalarının ortaya çıkarılması olası olmayacaktır ve ek testler yapılması gerekebilecektir. Yine de, azol dirençli *Aspergillus* suşlarının kül-

**Tablo. *Aspergillus*'ta hastada kazanılmış ve çevresel azol direncinin sık gözlenen özellikleri<sup>(4,9-10,38)</sup>.**

| Özellik                                                | Hastada kazanılmış direnç                                                                                                                                      | Çevresel direnç                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Azole maruziyet öyküsü                                 | Önceden veya devam eden azol tedavisi öyküsü var.                                                                                                              | Çoğu hastada azole maruziyet yok.                                                                                                                                              |
| Klinik form                                            | Aspergilloma/kaviter lezyon görülen ve in vivo sporulasyona olanak tanıyan CPA                                                                                 | Tüm <i>Aspergillus</i> hastalıklarında görülebilir. İA, ABPA, KF hastalarında kronik kolonizasyon vb.                                                                          |
| Mutasyonların çeşitliliği                              | Çok                                                                                                                                                            | Az                                                                                                                                                                             |
| Mutasyon sayısı                                        | Çok sayıda mutasyon olası                                                                                                                                      | Genellikle tek mutasyon                                                                                                                                                        |
| Farklı hastalardan elde edilen izolatların çeşitliliği | Çok                                                                                                                                                            | Az                                                                                                                                                                             |
| Direnç mutasyonlarının neden olduğu form kaybı         | Var<br>Koloni büyüklüğü, morfoloji ve sporulasyonda değişiklikler                                                                                              | Görünür form kaybı yok                                                                                                                                                         |
| Tanıda zorluk                                          | Azol duyarlı ve dirençli fenotipler eşzamanlı olarak bulunabilir. Azol dirençli fenotipin üreme hızı ve/veya sporulasyonu etkilenmiş olabilir.                 | Azol duyarlı ve dirençli fenotipler eşzamanlı olarak bulunabilir.                                                                                                              |
| Multiazol veya panazol direnci                         | Pozitif                                                                                                                                                        | Pozitif                                                                                                                                                                        |
| Azol tedavisi ile klinik başarısızlık                  | Bildirilmiş                                                                                                                                                    | Bildirilmiş                                                                                                                                                                    |
| Sık görülen mutasyonlara örnekler                      | <i>Cyp51A</i> geninde nokta mutasyonlar:<br>G54<br>P126<br>F219<br>M220<br>G138<br>Y431<br>G448<br><br><i>Cyp51A</i> geni dışı mutasyonlar:<br>HapE<br>AfCox10 | <i>Cyp51A</i> geni VE promotor bölge "tandem repeat" ("transcriptional enhancer") mutasyonları:<br>TR <sub>34</sub> /L98H<br>TR <sub>46</sub> /Y121F/T289A<br>TR <sub>53</sub> |

CPA: Kronik pulmoner aspergilloz; İA: İnvasiv aspergilloz; ABPA: Alerjik bronkopulmoner aspergilloz; KF: Kistik fibrozis

türde üremelerinin sorunlu olabilmesi nedeniyle, bu yöntemler çok değerli olabilirler<sup>(51)</sup>. Azole dirençli *Aspergillus*'un kültür veya PCR ile saptanamadığı olgularda bile CPA'da antifungal tedavi sırasında devam eden güçlü PCR pozitiflikleri direnç ile ilişkili olabilir<sup>(5)</sup>.

### Azol direncinin tedavi ve profilaksiye etkisi

Azoller farklı aspergilloz klinik formlarının tedavisinde ilk seçenek olarak önerilmektedirler<sup>(2,4,6)</sup>. Ayrıca, İA profilaksisinde elimizdeki tek oral seçenektirler<sup>(4,6)</sup>. Azol dirençli *Aspergillus* izolatlarının genellikle çoklu direnç veya panazol direnci göstermesi, durumu daha da zorlaştırmaktadır<sup>(4,45,52)</sup>. Dirençli suşlarla gelişen enfeksiyonlarda azol tedavisi ile başarısızlık rapor edilmiştir<sup>(4,6,9,10,12)</sup>. Azol dirençli *Aspergillus* ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde lipozomal amfoterisin B, ekinokandin ve kombinasyon tedavileri kullanılabilir<sup>(4-6,9,53,54)</sup>. Ancak, bu alternatiflere geçiş maliyeti artırmakla birlikte etkinliği garanti etmemektedir<sup>(4,6,55)</sup>. Farklı bölgelere, hatta merkezlere göre değişkenlik göstermekle birlikte, bildirilen azol direnç oranları hâlen genel olarak düşük seyretmektedir<sup>(4,6,37,40,52,56)</sup>. Bu nedenle, IDSA ilk enfeksiyon sırasında izole edilen *Aspergillus* suşlarının rutin olarak test edilmesini önermemektedir<sup>(6)</sup>. ESCMID ise, invaziv hastalığı olan kişilerden elde edilen izolatlar için, sürveyans programlarında yüksek direnç saptanan bölgelerde, tedaviye yanıt olmayan hastalarda ve agar tarama testi pozitif olan izolatlarda referans yöntem ile antifungal duyarlılık testi önermektedir<sup>(7)</sup>. Yine de bir merkezde saptanan azol direnç oranı %10'un üzerinde ise ilk seçenek olarak azol dışında bir antifungale geçilmesi uygun bulunmaktadır<sup>(4,9,57)</sup>. Azol direncinin uzun süreli tedavi sırasında ortaya çıkabileceği ve azole daha önce maruz kalmamış hastaların da azol dirençli fenotipler ile enfekte olabilecekleri akılda tutulmalıdır<sup>(4,9,58-60)</sup>. Atipik morfolojiye sahip izolatların azol dirençli olma olasılıkları daha yüksektir ve test edilmele-

ri gerekmektedir<sup>(6,10)</sup>. İntrinsik veya kazanılmış azol direnci gösterebilen kriptik *Aspergillus* türlerinin de ortaya çıkabilecekleri unutulmamalıdır<sup>(6,17,61)</sup>.

### Sonuç

*Aspergillus* türleri doğada yaygın olarak bulunurlar ve çok farklı klinik tablolara yol açabilirler. Birincil hedefleri bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar olsa da, konağın özelliklerine bağlı olarak farklı klinik formlar ortaya çıkabilmekte ve daha önce düşünülenenden çok daha fazla sayıda kişi *Aspergillus* ile ilişkili hastalıklardan etkilenebilmektedir<sup>(2-4,6,10)</sup>. Aspergilloz için tanı henüz ideal düzeyde değildir ve geliştirilmesi gerekmektedir. Kültür ve doğrudan mikroskopi gibi konvansiyonel tanı yöntemlerinin duyarlılıkları düşüktür. Serolojik testler hastalığın tanısında yararlı olabilmekle birlikte, etkinin kesin olarak tanımlanmasına yardımcı olamamaktadırlar. Moleküler testler umut verici görünmektedir ama hâlen standart hale getirilmeleri ve onaylanmaları gerekmektedir<sup>(4,6)</sup>. Tüm klinik formların tedavisi, temelde ilk tedavi seçeneği olarak önerilen azollere dayanmaktadır. Azoller mortalite oranlarının azaltılmasında başarılı olmuştur. Bu nedenle, azol direncinin ortaya çıkması ve yayılması olumlu gelişmeleri tehdit etmektedir<sup>(9)</sup>. *Aspergillus*'un azol dirençli mutantları atipik morfolojide olabilmekte, üretilmeleri ve tanımlanmalarında zorluk yaşanabilmektedir. Ayrıca seçici azol tedavisi altında *A. fumigatus sensu stricto*'dan ayrımı güç olan azol dirençli kriptik türler de ortaya çıkabilmektedir<sup>(17)</sup>. Sonuç olarak, azol dirençli bir *Aspergillus* suşu ile gelişen enfeksiyon durumunda, tanısı ve tedavisi zaten yetersiz olan bir tablo daha da karmaşık bir hâle gelmektedir. Antimikrobiyallere dirençli bir ajanla gelişen diğer enfeksiyonlarda da görüldüğü gibi, azol dirençli *Aspergillus* ile gelişen enfeksiyonların daha pahalı ilaçlarla daha uzun süre tedavi edilmesi gerekmekte ancak sonuç daha kötü

olmaktadır<sup>(4,6,9)</sup>. *Aspergillus*'ta azol direncinin yayılmasının engellenmesi, multidisipliner ve global bir çaba gerektirmektedir<sup>(4,9)</sup>. Bazı kanıtlar çevresel azol kullanımının direnç gelişimini tetikleyebildiğini gösterse de, tarımda azollerin kısıtlanması var olan dirençli suşların yayılımını engellemeyebileceği ve tarımsal ürün miktarında azalmaya neden olabileceği için önlemler dikkatle planlanmalıdır<sup>(1)</sup>. Aspergilloz tanısında kullanılan yöntemlerin iyileştirilmesi, klinik suşlarda azol duyarlılığının rutin olarak test edilmesi, azol direncinin saptanması için moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ve kapsamlı sürveyans çalışmaları sorunun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olarak bu patojene karşı savaşılabilmek için en iyi stratejilerin oluşturulmasına olanak sağlayabilecektir<sup>(4,9,10)</sup>.

## KAYNAKLAR

- Denning DW, Perlin DS. Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiol*. 2011;6(11):1229-32. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.118>
- Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ*. 2011;89(12):864-72. <https://doi.org/10.2471/BLT.11.089441>
- Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med Mycol*. 2013;51(4):361-70. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738312>
- Kleinkauf N, Verweij PE, Arendrup MC, et al. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. Stockholm: ECDC, 2013.
- Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47(1):45-68. <https://doi.org/10.1183/13993003.00583-2015>
- Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):e1-e60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arıkan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(Suppl1):e1-e38. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.002>
- Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001;32(3):358-66. <https://doi.org/10.1086/318483>
- Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis*. 2016;62(3):362-8. <https://doi.org/10.1093/cid/civ885>
- Verweij PE, Zhang J, Debets AJ, et al. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(11):e251-e260. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30138-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30138-4)
- van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1846-54. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110226>
- Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(7):1068-76. <https://doi.org/10.3201/eid1507.090043>
- Zhang J, Debets AJ, Verweij PE, et al. Asexual sporulation facilitates adaptation: The emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Evolution*. 2015;69(10):2573-86. <https://doi.org/10.1111/evo.12763>
- Larone DH. Medically Important Fungi A Guide to Identification. 5 ed. Washington DC: ASM Press, 2011.
- Procop GW, Church DL, Hall GS, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017.
- Mitchell TG. Mycology. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, Eds. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, USA: McGraw-Hill Companies Inc., 2013:671-714.
- Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Front Microbiol*. 2016;7:683. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00683>
- Schwarz C, Hartl D, Eickmeier O, et al. Progress in definition, prevention and treatment of fungal infections in cystic fibrosis. *Mycopathologia*. 2018;183(1):21-32. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0182-0>
- Singh A, Ralhan A, Schwarz C, Hartl D, Hector A. Fungal pathogens in CF airways: leave or treat? *Mycopathologia*. 2018;183(1):119-37. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0184-y>
- Chen SC, Meyer W, Pashley CH. Challenges in laboratory detection of fungal pathogens in the airways of cystic fibrosis patients. *Mycopathologia*. 2018;183(1):89-100. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0150-8>
- Seyedmousavi S, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Pharmacodynamics and dose-response relationships of liposomal amphotericin B against different azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1866-71. <https://doi.org/10.1128/AAC.02226-12>



22. Seyedmousavi S, Mouton JW, Melchers WJG, Verweij PE. In vivo efficacy of liposomal amphotericin B against wild-type and azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates in two different immunosuppression models of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):e02479-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02479-16>
23. Seyedmousavi S, Bruggemann RJ, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Pharmacodynamics of anidulafungin against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in a nonneutropenic murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):303-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.01430-12>
24. Seyedmousavi S, Meletiadis J, Melchers WJ, et al. In vitro interaction of voriconazole and anidulafungin against triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(2):796-803. <https://doi.org/10.1128/AAC.00980-12>
25. Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood.* 2005;106(8):2641-5. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0733>
26. Levitz SM. *Aspergillus* vaccines: Hardly worth studying or worthy of hard study? *Med Mycol.* 2017;55(1):103-8. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw081>
27. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(6):1364-8.
28. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4465-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.00185-11>
29. Manavathu EK, Vazquez JA, Chandrasekar PH. Reduced susceptibility in laboratory-selected mutants of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole due to decreased intracellular accumulation of the antifungal agent. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;12(3):213-9. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(98)00102-2)
30. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):291-321. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08>
31. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis.* 2009;9(12):789-95. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70265-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70265-8)
32. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2116-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq279>
33. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):1120-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1120-1124.2003>
34. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* 2008;5(11):e219. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050219>
35. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2747-50. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2747-2750.2004>
36. Bader O, Tunnermann J, Dudakova A, et al. Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4356-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00100-15>
37. van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(6):1041-4. <https://doi.org/10.3201/eid2106.140717>
38. Wei X, Chen P, Gao R, et al. Screening and characterization of a non-*cyp51A* mutation in an *Aspergillus fumigatus* *cox10* strain conferring azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(1):e02101-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02101-16>
39. van Ingen J, van der Lee HA, Rijs TA, et al. Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR<sub>34</sub>/L98H and TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):178-81. <https://doi.org/10.1093/jac/dku364>
40. Ozmerdiven GE, Ak S, Ener B, et al. First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR<sub>34</sub>/L98H mutations in Turkey. *J Infect Chemother.* 2015;21(8):581-6. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.04.012>
41. Sharma C, Hagen F, Moroti R, Meis JF, Chowdhary A. Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? *J Glob Antimicrob Resist.* 2015;3(2):69-74. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.01.005>
42. Shalhoub S, Luong ML, Howard SJ, et al. Rate of *cyp51A* mutation in *Aspergillus fumigatus* among lung transplant recipients with targeted prophylaxis. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(4):1064-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dku528>
43. Mavridou E, Meletiadis J, Jancura P, et al. Composite survival index to compare virulence changes in azole-resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolates. *PLoS One* 2013;8(8):e72280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072280>
44. CLSI. CLSI Document M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
45. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3251-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00536-10>
46. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, et al. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.3.1 Method for the



- determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.(version 9.3.1 valid from 15 January, 2017). [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility\\_testing\\_of\\_moulds/](http://www.eucast.org/ast_of_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_moulds/) (Erişim Tarihi: Ocak 2018)
47. Hope WW, Cuenca-Estrella M, Lass-Florl C, et al. EUCAST technical note on voriconazole and *Aspergillus* spp. Clin Microbiol Infect. 2013;19(6):E278-80. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12148>
  48. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Florl C, et al. EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. Clin Microbiol Infect. 2012;18(7):E248-50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03890.x>
  49. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, et al. EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. Clin Microbiol Infect. 2016;22(6):571.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.017>
  50. van der Linden JWM, Arendrup MC, van der Lee HAL, Melchers WJG, Verweij PE. Azole containing agar plates as a screening tool for azole resistance of *Aspergillus fumigatus*. Mycoses. 2009;52(s1):19.19.
  51. Denning DW, Park S, Lass-Florl C, et al. High-frequency triazole resistance found In nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. Clin Infect Dis. 2011;52(9):1123-9. <https://doi.org/10.1093/cid/cir179>
  52. Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, et al. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother. 2014;69(6):1533-6. <https://doi.org/10.1093/jac/dku009>
  53. Hamprecht A, Morio F, Bader O, Le Pape P, Steinmann J, Dannaoui E. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a matter of concern? Mycopathologia. 2018;183(1):151-60. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0162-4>
  54. Lepak AJ, Marchillo K, VanHecker J, Andes DR. Impact of in vivo triazole and echinocandin combination therapy for invasive pulmonary aspergillosis: enhanced efficacy against Cyp51 mutant isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(11):5438-47. <https://doi.org/10.1128/AAC.00833-13>
  55. Ostermann H, Solano C, Jarque I, et al. Cost analysis of voriconazole versus liposomal amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis among patients with haematological disorders in Germany and Spain. BMC Pharmacol Toxicol. 2014;15:52. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-52>
  56. Prigitano A, Esposto MC, Biffi A, et al. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis in Italy. J Cyst Fibros. 2017;16(1):64-9. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.06.006>
  57. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. Drug Resist Updat. 2015;21-22:30-40. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.001>
  58. Camps SM, van der Linden JW, Li Y, et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(1):10-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.05088-11>
  59. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, et al. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. J Clin Microbiol. 2011;49(6):2243-51. <https://doi.org/10.1128/JCM.00213-11>
  60. Astvad KM, Jensen RH, Hassan TM, et al. First detection of TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A and TR<sub>34</sub>/L98H alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naïve patients in Denmark despite negative findings in the environment. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):5096-101. <https://doi.org/10.1128/AAC.02855-14>
  61. Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4802-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00304-11>

# Jasplakinolid ile F-aktin Stabilizasyonu Uygulanan Endotel Hücrelerinde Difteri Toksini Trafığı

Bilge ÖZERMAN EDİS\*<sup>✉</sup>, Ebru HACIOSMANOĞLU\*\*<sup>✉</sup>, Başak VAROL\*<sup>✉</sup>, Muhammet BEKTAŞ\*<sup>✉</sup>

\*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul

\*\*İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

## ÖZ

**Amaç:** Ökaryotik hücrelerde mikrofilament yapısının ana bileşeni olan aktin, sinyal yollarını aktin bağlayan proteinlerle etkileşerek düzenler. Daha önceki çalışmalarımızda difteri toksini ve mutant difteri toksini (CRM-197) ile enfekte olan endotel hücrelerinde toksinin A fragmenti ile etkileşen filamentöz aktinin depolimerleştiği saptanmıştır. Bu çalışmada endotel hücrelerinde F-aktin stabilizasyonu sağlanarak difteri toksininin hücre içi trafiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Hücre kültüründe endotel hücreleri çoğaltıldı ve jasplakinolid (0.1 µmol/ml) ile sırası ile 30 ve 60 dakika uygulandı. Difteri toksini (0.75 nmol/ml) uygulaması için jasplakinolid ile inkübasyon süresi 15 dakika ile sınırlandırıldı. Hücre içi F-aktin stabilizasyonu ve difteri toksini trafiği immüno Floresan mikroskopisi ile görüntülendi.

**Bulgular:** Bekletme süresine bağlı olarak stres liflerinin jasplakinolid uygulanan endotel hücrelerinin hücre zarında belirginleştiği belirlendi. F-aktin stabilizasyonu sağlanan endotel hücrelerinde difteri toksini trafiğinin engellenmediği ve A fragmenti'nin perinükleer alana yöneldiği görüntülendi.

**Sonuç:** Hücre içinde F-aktin stabilizasyonu ile G-aktin/F-aktin dönüşümünün engellenmesi difteri toksini trafiğini durdurmamaktadır. Bu sonuç toksin trafiğinde filamentöz aktinin önemini gösteren çalışmaları desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Difteri toksini, F-aktin, HUVEC

## ABSTRACT

**F-actin Stabilization by Jasplakinolide in Endothelial Cells and Diphtheria Toxin Traffic**

**Objective:** Actin, the main component of microfilament structure in eukaryotic cells, regulates signaling pathways by interacting with actin binding proteins. Our previous studies have shown that depolymerization of filamentous actin (F-actin) occurs following its interaction with fragment A of the toxin in endothelial cells infected with diphtheria toxin and mutant diphtheria toxin (CRM-197). In this study, it was aimed to determine intracellular trafficking of diphtheria toxin by stabilization of F-actin in endothelial cells.

**Material and Methods:** Human umbilical vein endothelial cells were cultured and incubated with 0.1 µM jasplakinolide for 30 and 60 minutes respectively. For diphtheria toxin (0.75 nM) treatment, the incubation period with jasplakinolide was limited to 15 minutes. Intracellular stabilization of F-actin and diphtheria toxin traffic were visualized using immunofluorescence microscopy.

**Results:** Depending on the duration of the incubation period, it was determined that the stress fibers were expressed in the cell membrane of the endothelial cells treated with jasplakinolide. It was shown that diphtheria toxin trafficking was not inhibited in F-actin-stabilized endothelial cells and fragment A was directed to the perinuclear area.

**Conclusion:** Inhibition of G-actin / F-actin turnover in steady state by intracellular F-actin stabilization does not stop diphtheria toxin trafficking. This result supports studies showing the importance of filamentous actin in toxin trafficking.

**Keywords:** Diphtheria toxin, F-actin, HUVEC

## GİRİŞ

Aktin, ökaryotik hücrelerde, mikrofilament yapısının temel bileşenini oluşturmaktadır ayrıca

yapısal ve düzenleyici proteinler ile etkileşerek sinyal yollarında kavşak görevi gören bir motor proteindir<sup>(1)</sup>. Aktin hücre içinde hem monomer hem polimer yapıda bulunur.

Alındığı tarih: 19.02.2018

Kabul tarihi: 21.06.2018

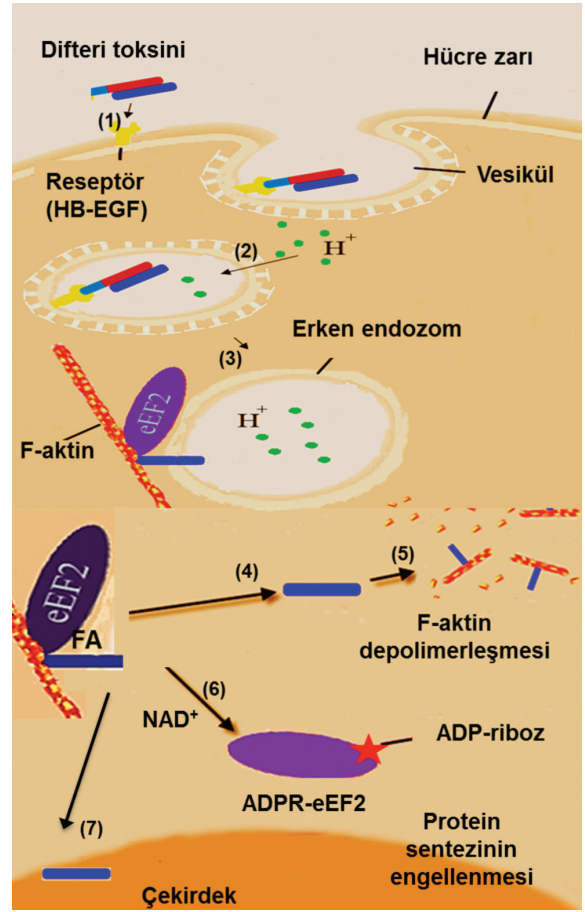
## Yazarların ORCID bilgileri:

Bilge Özerman Edis 0000-0002-3499-0474 Ebru Haciosmanoğlu 0000-0001-9559-4515

Başak Varol 0000-0002-0597-4571 Muhammet Bektaş 0000-0002-4438-1664

Monomerik aktin (G-aktin) molekülleri sarmal olarak polimerleşerek filamentöz aktini (F-aktin) oluşturur. Konak hücrenin aktin iskeleti, patojenlerin istilası ve patojenlerin hücre içi hareketi sırasında yeniden düzenlenir<sup>(2)</sup>. Bazı protein yapıdaki bakteriyel toksinlerin glikozilleme, adenilleme, Adenozin difosfat (ADP)-ribozilleme ve deamidleme gibi translayon sonrası modifikasyonlar ile aktin iskeletinin yapısının bozulmasına neden olduğu bilinmektedir<sup>(3)</sup>.

Bakteriyel peptid olan difteri toksini (DT) ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF2)'yi hedef alır ve ancak nikotin amid dinükleotid (NAD)'in varlığında eEF2'yi ADP-ribozilleyerek eEF2'nin etkinliğini geri dönüşümsüz olarak baskılar. DT, eEF2'nin ADP-ribozillenmesi sonucu protein sentezinin durmasına neden olur<sup>(4)</sup>. Bununla beraber, DT aktin filamentlerinin depolimerleşmesine neden olurken bir yandan da nükleaz etkinliği gösterir<sup>(5,6)</sup>. Bu toksininin yapısı, hücre içine alınması ve etkinlik aşamaları ayrıntılı olarak sunulmuştur<sup>(7)</sup>. DT hücre içine endositik yolla taşınır ve enzimatik etkinliğe sahip olan kısmı fragment A (FA) sitosolik translokasyon faktörleri aracılığı ile sitozole geçer<sup>(8)</sup> (Şekil 1). FA ve aktinin etkileşimi deneysel olarak gösterilmiştir<sup>(5)</sup>. Yaptığımız çalışmalarla FA'nın erken endozomlardan salınmasında, FA'nın hedefi olan eEF2 ve aktinin birlikte etkili olduğunu saptadık<sup>(9)</sup>. FA-eEF2-aktin etkileşimleri sonucu eEF2'nin ADP ribozillenmesinin dışında, hücrede aktin filamentlerinin depolimerleşerek yıkıldığını belirledik<sup>(10)</sup>. Ayrıca gerek FA-aktin arasında gerekse mutant difteri toksini-aktin arasında olası etkileşim noktalarını moleküler modelleme yöntemleri ile belirledik<sup>(11,12)</sup>. Bu bilgiler doğrultusunda endotel hücrelerinde aktin filamentlerinin sabitlendiği bir durumun difteri toksini hareketini nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık. Bunun için zar geçirgen özelliği olan ve F-aktin stabilizasyonunu sağlayan jaspilaklinolidi hücre kültürü ortamında endotel



Şekil 1. Difteri toksininin hücreye girişi ve etkinlik aşamaları.

Difteri toksini R-domain ile hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanır (1) ve klatrine bağlı endozitoz ile hücre içine girer (2). Düşük pH ile tetiklenen konformasyonel değişim sonucu T-domain, endozomal zardan toksinin sitozole geçiş basamaklarını başlatır (3). Katalitik olan toksindeki C-domain, fragment A (FA), endozomlardan sitozole, sitosolik translokasyon faktörleri aracılığı ile geçer. Bu süreçte disülfid bağları indirgenir ve şaperonlar aracılığı ile peptid yapı yeniden katlanır (4). F-aktinin depolimerleşme süreci tetiklenirken, FA sitozoldeki NAD<sup>+</sup> ile eEF2'yi ADP-ribozilleyerek protein sentezinin durmasına neden olur (5,6). Çekirdeğe ulaşan FA nükleaz etkinliği gösterir (7).

hücrelerine uyguladık. Bu koşullar altında difteri toksini verilen hücrelerde toksinin hücre içi hareketini immunfloresan mikroskopi yöntemi ile inceledik.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Kimyasallar:** Hücre kültür malzemeleri Nunc ve Falcon firmalarından sağlandı. Çalışmalarda jaspilaklinolid (AdipoGen), DT (Calbiochem),

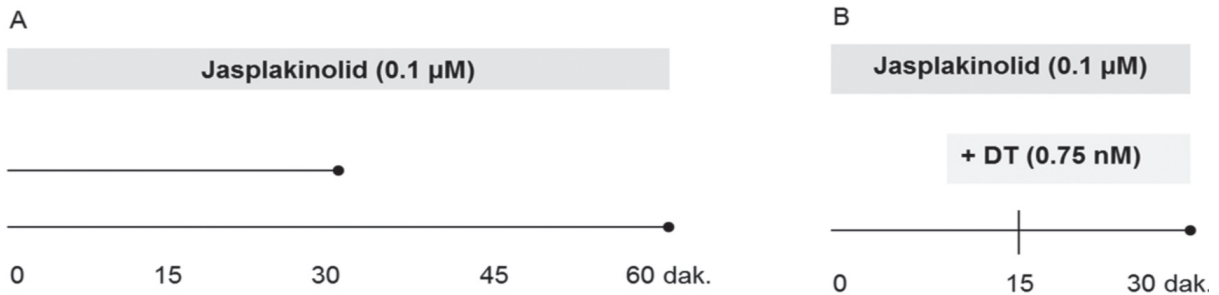
birinci antikor olarak anti-FA (7F2) (Santa Cruz), ikinci antikor olarak anti-fare IgG-Tetrametilrodamin izotiyosiyanat (TRITC) (Santa Cruz), falloidin-Fluoresein izotiyosiyanat (FITC) (Sigma) ve preparatlarda koruyucu olarak ProLong Gold anti-fade (Invitrogen) kullanıldı.

**Hücre kültürü ve uygulamalar:** Çalışmada hücre soyu olarak insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC) kullanıldı. Hücreler standart kültür koşullarında, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren Dulbecco modifiye Eagle medium (DMEM) F-12 içinde 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li kültür ortamında çoğaltıldı. Hücrelerin canlılık belirlenmesi tripan mavisi ayırma yöntemi ile yapıldı. Hücreler, floresans mikroskopta incelenmek üzere içinde yuvarlak lamel bulunan 6 kuyulu hücre plaklarına (1x10<sup>6</sup> hücre/ml) ekildi ve hücrelerin yapışması için gece boyu beklendi. İlk aşamada hücrelerde F-aktin stabilizasyonunu sağlamak üzere kuyulara jasplakinolid (0.1 µmol/ml) ilave edilerek 30 ve 60 dakika boyunca inkübe edildi<sup>(15)</sup>. İkinci aşamada jasplakinolidin medium içinde toplamda bulunma süresi 30 dakika olacak şekilde düzenlendi. Bunun için 0.1 µmol/ml jasplakinolid ile 15 dakika inkübe edilen hücreler difteri toksini (0.75 nmol/ml) ile enfekte edildi ve 30 dakika tamamlandığında medium uzaklaştırıldı. Hücreler fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve immünfloresan incelemeye geçildi<sup>(10)</sup>.

İmmünfloresan inceleme: HUVEC'lerde aktin iskeleti F-aktine bağlanan falloidin-FITC (1:1000) ile işaretlendi. DT uygulanan hücrelere FA'nın hücre içi lokalizasyonu, anti-FA monoklonal antikor 7F2 (1:1000) ve anti-fare IgG-TRITC ikinci antikor kullanılarak görünlendi. İmmünfloresan inceleme için öncelikle yuvarlak lameller üzerine yayılmış hücreler PBS ile yıkandı ve %0.01 Triton X-100 /PBS çözeltisinde 10 dk. bekletildi. Belirleme için %2 paraformaldehit/PBS ortamında 1 saat 4°C'de inkübe edildikten sonra %1 PBS-BSA ile seyreltilen birinci antikor ile 2 saat boyunca inkübe edildi. Floresan işaretli ikinci antikorlar %1 PBS-BSA ile 1:2000 oranında seyreltildi ve 1 saat boyunca uygulandı. Floresan işaretli boyanın erken solmasını önlemek ve çekirdeklerin işaretlenmesini sağlamak amacı ile DAPI içeren ProLong Gold anti-fade kapatma sıvısı kullanıldı. Preparatlar floresan mikroskopta (Olympus BX51) immersiyon objektifi ile x100 büyütmede tekli ve üçlü filtreler ile incelendi. Görüntüler Olympus DP-72 kamera sistemi ve DP2-TWAIN yazılım programı ile fotoğraflandı.

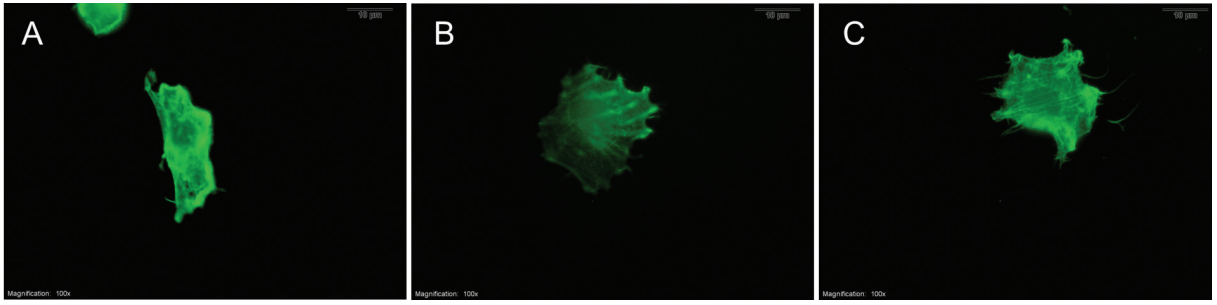
## BULGULAR

Endotel hücrelerinde F-aktin stabilizasyonu gereç ve yöntemde belirtildiği gibi jasplakinolid ile oluşturuldu (Şekil 2A). Jasplakinolid (0.1 µmol/ml) uygulanan HUVEC'lerde inkübasyon süresine bağlı olarak filamentöz aktinin



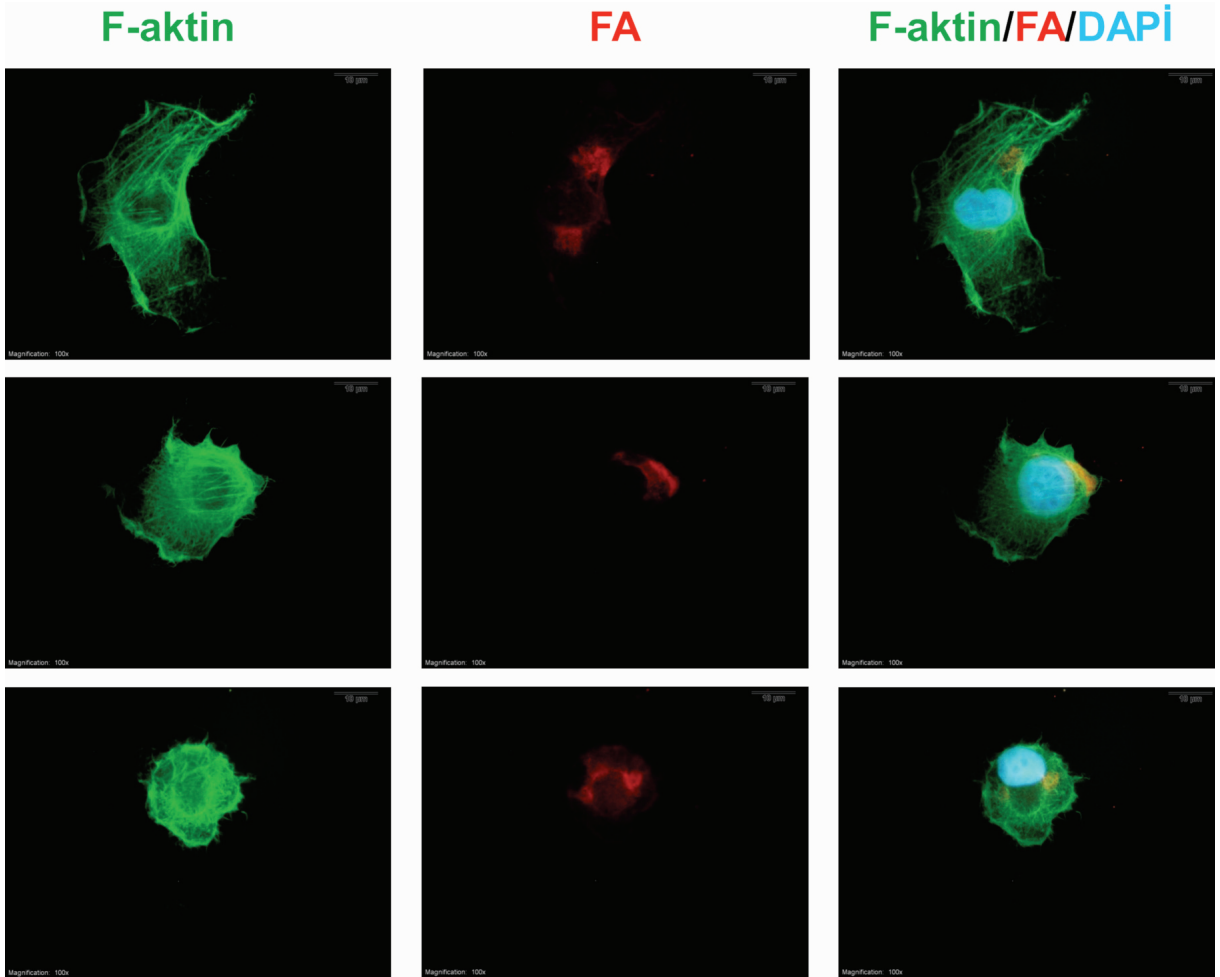
Şekil 2. Hücre kültürü ortamında kimyasalların uygulanma süreleri.

Kuyulara jasplakinolid (0.1 µmol/ml) ilave edilerek 30 ve 60 dakika bekletildi (A). Jasplakinolid ile inkübasyon süresinin 30 dakika olduğu çalışmanın 15. dakikasında hücrelere DT (0.75 nmol/ml) uygulandı (B). İnkübasyon sürelerinin ardından medium uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve immünfloresan işaretleme yapıldı.



Şekil 3. Endotel hücrelerine jasplakinolid uygulaması.

(A) İmmüno floresan görüntüleme için klasik hücre kültürü ortamında çoğaltılan HUVEC'ler yuvarlak lameller üzerine aktarıldı. Kontrol olarak kullanılan (A) ve 30 dakika (B) ile 1 saat (C) jasplakinolid ( $0.1 \mu\text{mol/ml}$ ) ile inkübe edilen HUVEC'lerde aktin iskeleti (yeşil) falloidin-FITC ile işaretlendi. Filamentöz aktinin oluşturduğu stres liflerinin jasplakinolid uygulanan hücrelerde (B, C) belirginleştiği görülmektedir (Büyütme  $\times 100$ ).



Şekil 4. Jasplakinolid uygulanan endotel hücrelerinde FA hareketi.

HUVEC'ler yöntemde belirtildiği gibi jasplakinolid ( $0.1 \mu\text{mol/ml}$ ) ve DT ( $0.75 \text{ nmol/ml}$ ) ile inkübe edildikten sonra hücrelerde aktin iskeleti (yeşil) falloidin-FITC ile işaretlendi. FA monoklonal antikor 7F2 ve ikinci antikor olarak IgG-TRITC (kırmızı) ile işaretlendi. Hücre çekirdekleri (mavi) DAPI ile işaretlendi. Jasplakinolid ile aktin filamentleri sabitlenen hücrelerde FA'nın perinükleer alana yerleştiği görülmektedir (Büyütme  $\times 100$ ).



oluşturduğu stres liflerinin hücre zarında belirginleştiği belirlendi (Şekil 3). Bu bulguya dayanarak difteri toksini uygulanmadan önce hücrelerin jasplakinolid ile bekletilme süresi 15 dakika ile sınırlandırıldı. Aktin filamentlerinin stabilizasyonunun ardından toksinin endositik süreçteki hareketini gözlemek amacı ile hücreler difteri toksini ile 15 dakika inkübe edildi. (Şekil 2B). Bu koşullar altında aktin filamentleri, FA ve çekirdek immünfloresan işaretleme ile görüntülendi. Jasplakinolid uygulaması ile aktin filamentlerindeki dinamiğin durdurulduğu halde endotel hücrelerinde difteri toksininin perinükleer bölgede kümeleniği gösterildi (Şekil 4). Bu bulgu, toksin hareketinin jasplakinolid etkisi ile engellenmediğini göstermektedir.

## TARTIŞMA

Aktin iskeleti, hücre göçü, morfogenez, sitokinez, endositoz ve fagositoz gibi çeşitli hücresel süreçlerde temel bir role sahiptir. Bunun sonucu olarak aktin iskeletinin yapısının ve dinamiklerinin hassas olarak düzenlenmesi, ökaryotik organizmalardaki birçok gelişimsel ve fizyolojik süreçler için gereklidir. Hücrelerin kendi aralarındaki ve çevreleriyle arasındaki biyokimyasal ve mekanik etkileşimler aktin iskeletine bağlı oluşan stres fiberlerinin miktarını, yapısını ve organizasyonunu değiştirir<sup>(13)</sup>.

Jasplakinolid uygulanan endotel hücrelerinde filamentöz aktinin oluşturduğu stres liflerinin inkübasyon süresine bağlı olarak hücre zarında uzantılar oluşturduğunu görüntüledik. Halkasal peptid olan jasplakinolidin yüksek ilginlikle ( $K_d = 15$  nM) aktin filamentine 1:1 stokiometri ile bağlandığı bilinmektedir<sup>(14)</sup>. Zamana ve konsantrasyona bağlı olarak jasplakinolid uygulamasının endotel hücrelerine zarar verdiği belirlenmiştir<sup>(15)</sup>. Bu bilgiler doğrultusunda DT'nin hareketini gözlemek üzere F-aktin stabilizasyonu için jasplakinolid uygulama konsantrasyonu 100 nmol/ml seçildi ve süre 15

dakika ile sınırlandırıldı.

Jasplakinolid ile F-aktinin sabitlendiği bu koşullar altında DT hareketinin endotel hücrelerinde engellenmediğini belirledik. DT'nin hücre içi trafiği, kalımlılığı ve F-aktinin FA hareketine etkisini sorguladığımız önceki çalışmalarımızla toksinin çekirdek çevresine ulaşmasında FA-eEF2-aktin etkileşiminin gerekli olduğu belirlenmiştir<sup>(9,10)</sup>. Sitokalsin D ile F-aktinin uzamasının engellendiği koşullarda ise difteri toksininin endozomdan sitozole geçmediği belirlenmiştir<sup>(9)</sup>. Mutant difteri toksini, CRM197 ile aktin arasında en yüksek olasılıkla etkileşebilecek amino asitlerden sisteinlerin toksin translokasyonunu sağlayan T-domaini üzerinde yer aldığı belirtilmiştir<sup>(12)</sup>.

Tarafımızca sitokalsin D ile yapılan çalışmalarda, DT'nin katalitik domeyni olan FA'nın erken endozomlarda tutulduğu ve perinükleer alana kadar ilerleyemediği gözlemlenmiştir<sup>(9)</sup>. Bu çalışmada, aktin iskeletiyle etkileşen jasplakinolidin varlığında FA'nın hareketinin devam ettiği, aktin filamenti stabilizasyonu ile FA'nın taşınmasına engel olunamadığı gösterilmektedir. Bu da DT'nin reseptör aracılı endositoz ile taşınmasına rağmen, jasplakinolid varlığında kalatrin bağımsız endositoz ile olabileceğini düşündürmektedir. Hücre içinde G-aktin/F-aktin dönüşümünün durmasının difteri toksini hareketini engellememesi filamentöz aktinin endositik süreçteki önemini destekler niteliktedir.

Jasplakinolid uygulamasının transferrinin reseptör aracılı endositozu arttırmadığı ve bu nedenle muhtemelen kalatrin bağımsız endositozu arttırdığı belirtilmiştir. Sitokalsin D ve jasplakinolid arasındaki farklılıkların nedeni, hücrelerin apikal ve bazolateral kutuplarıyla ilişkili aktin birikimlerinin (havuzlarının) farklılıkları ve/veya bu ajanların bu farklı aktin havuzları üzerindeki diferansiyel aktivitesini yansıtabileceği düşünülmektedir<sup>(16)</sup>.

DT'nin G-aktin molekülüne bağlandığı, toksinin endositik süreçte erken endozomlardan salınımına pozitif katkı sağladığı bilinmektedir<sup>(5,9)</sup>. Ayrıca DT'nin eEF2'yi ADP-ribozilleyerek inhibe ettiği oysa toksinin mutant formu, CRM197'nin protein sentezini durdurmazken aktin filamentleri ile etkileştiği bilinmektedir<sup>(12)</sup>. Sonuç olarak, bu çalışma, konak hücre iskeleti ve DT etkileşimi bağlamında moleküler mekanizmalara katkıda bulunmanın dışında farmakolojik açıdan da değerlendirilebilir. Kanserle karşı geliştirilmeye çalışılan ilaçlar arasında DT'yi temel alan kimyasal bileşenlerin ya da CRM197'nin kullanıldığı ilaç-taşıyıcı moleküllerin hücre içindeki endositik sürecinin yanı sıra hücre iskeleti ile olan ilişkilerinin takip edilmesi açısından önemlidir.

**Teşekkür:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numaraları: 21270, 42511, 24824.

## KAYNAKLAR

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
2. Lamason RL, Welch MD. Actin-based motility and cell-to-cell spread of bacterial pathogens. Curr Opin Microbiol. 2017;35:48-57. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.007>
3. Aktories K, Schwan C, Papatheodorou P, Lang AE. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. Toxicon. 2012;60(4):572-81. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.338>
4. Collier RJ. Diphtheria toxin: mode of action and structure. Bacteriol Rev. 1975;39(1):54-85.
5. Bektaş M, Varol B, Nurten R, Bermek E. Interaction of diphtheria toxin (fragment A) with actin. Cell Biochem Funct. 2009;27(7):430-9. <https://doi.org/10.1002/cbf.1590>
6. Lessnick SL, Lyczak JB, Bruce C, et al. Localization of diphtheria toxin nuclease activity to fragment A. J Bacteriol. 1992;174(6):2032-8. <https://doi.org/10.1128/jb.174.6.2032-2038.1992>
7. Varol B, Özerman Edis B, Bektaş M. Toxin structure, delivery and action. In: Burkovski A, ed. *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. Netherlands: Springer, 2013:83-94.
8. Schuster M, Schnell L, Feigl P, et al. The Hsp90 machinery facilitates the transport of diphtheria toxin into human cells. Sci Rep. 2017;7(1):613. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00780-x>
9. Bektaş M, Hacısmanoğlu E, Özerman B, Varol B, Nurten R, Bermek E. On diphtheria toxin fragment A release into the cytosol-cytochalasin D effect and involvement of actin filaments and eukaryotic elongation factor 2. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2011;43(9):1365-72. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.05.017>
10. Varol B, Bektaş M, Nurten R, Bermek E. The cytotoxic effect of diphtheria toxin on the actin cytoskeleton. Cell Mol Biol Lett. 2012;17(1):49-61. <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0036-6>
11. Ünlü A, Bektaş M, Şener S, Nurten R. The interaction between actin and FA fragment of diphtheria toxin. Mol Biol Rep. 2013;40(4):3135-45. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2387-0>
12. Özerman Edis B, Varol B, Hacısmanoğlu E, Ünlü A, Bektaş M. Cross-reacting material 197 (CRM197) affects actin cytoskeleton of endothelial cells. Gen Physiol Biophys. 2017;36(4):383-9. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2017006](https://doi.org/10.4149/gpb_2017006)
13. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. J Cell Sci. 2012;125(Pt 8):1855-64. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>
14. Visegrády B, Lorinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M. A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. FEBS Lett. 2005;579(1):6-10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.023>
15. Greene W, Gao SJ. Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. PLoS Pathog. 2009;5(7):e1000512. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000512>
16. Apodaca G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. Traffic. 2001;2(3):149-59. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.020301.x>

# Exophiala dermatitidis ve Exophiala phaeomuriformis Kökenlerinin Malaşit Yeşilini Renksizleştirme Aktivitelerinin Değerlendirilmesi<sup>§</sup>

Mustafa ŞENGÜL\*<sup>®</sup>, Çağrı ERGİN\*<sup>®</sup>, Engin KAPLAN\*\*<sup>®</sup>, Levent AKSOY\*<sup>®</sup>,  
Macit İLKİT\*\*\*<sup>®</sup>, G Sybren de HOOG\*\*\*\*<sup>®</sup>

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

\*\*İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin Üniversitesi, Mersin

\*\*\*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Adana

\*\*\*\*Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Hollanda

## ÖZ

**Amaç:** Malaşit yeşili (MY) tekstil endüstrisi ve kültür balıkçılığında yaygın olarak kullanılan, N-metillemiş diaminotriphenilmetan bir boyadır. Mikobakteri izolasyonu, spor boyama ve fotodinamik tedavi amaçlı olarak tıbbi mikrobiyolojide de kullanılır. Çevresel tehlikeli kirliliğe neden olan boyaların ortamdaki temizlenmesinde mikroorganizmaların kullanımı, günümüzde uygulanan yöntemlere önemli bir alternatiftir. Sunulan çalışmada, insanlar tarafından hidrokarbon atıklar ile kirlenmiş çevrede sıklıkla karşılaşılan Exophiala türlerinin malaşit yeşilini renksizleştirme aktiviteleri araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** MY renksizleştirme aktivitesini incelemek üzere çalışmaya, 109'u Exophiala dermatitidis (69 bulaşık makinesi, 33 demiryolu traversi ve 7 klinik kökeni) ve 82'si de Exophiala phaeomuriformis (32 bulaşık makinesi ve 50 demiryolu travers kökeni) olmak üzere toplam 191 köken dâhil edildi. Kökenlerin agar dilüsyon yöntemi ile MY duyarlılıkları ve renksizleştirme aktiviteleri incelendi. Tüm Exophiala kökenlerinin renksizleştirme aktiviteleri 32 µg/mL MY içeren buyyon besiyerinde spektrofotometrik olarak araştırıldı.

**Bulgular:** Agar dilüsyon yöntemi ile her iki tür Exophiala kökeninde, MY  $MIK_{90}$  değeri 128 µg/mL olarak bulundu. Göz ile incelemede, en iyi renksizleştirme aktivitesi  $\geq 32$  µg/mL MY konsantrasyonunda görüldü. Katı besiyerinde yapılan testlerde Exophiala türleri arasında MY renksizleştirme oranları yönünden farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ). Spektrofotometrik olarak yapılan renksizleştirme aktivitesi karşılaştırmalarında da, Exophiala türleri ve izolasyon bölgeleri arasında fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Tüm kökenler arasında, bulaşık makinesinden izole edilen bir E. dermatitidis kökeni %62.6 ile en yüksek renksizleştirme oranını gösterdi.

**Sonuç:** Exophiala cinsi gibi esmer mantarlarda görülen renksizleştirme potansiyeli ve çevresel ortamlardaki toksik boyaların biyolojik yıkımlarında uygulanabilirliği daha ileri araştırmalar ile değerlendirilmelidir.

**Anahtar kelimeler:** Renksizleştirme, biyo-yıkım, esmer mantar, Exophiala, malaşit yeşili

## ABSTRACT

**Evaluation of Malachite Green Decolorizing Activity of Exophiala dermatitidis and Exophiala phaeomuriformis Strains**

**Objective:** Malachite green (MG), an N-methylated diaminotriphenylmethane dye, is widely used in aquaculture, textile industry, and various microbiological techniques including mycobacterial isolation, spore dying, and photodynamic therapy. The use of microbes for the removal of environmentally hazardous dyes is emerging as a promising alternative to the current treatments. In this study, MG-degradation activity of Exophiala species, which are regularly encountered in human-made, hydrocarbon-polluted environments, has been examined.

**Material and Methods:** In order to investigate the MG decolorization activities a total of 191 Exophiala strains consisting of 109 Exophiala dermatitidis strains isolated from 69 dishwashers, 33 railway sleepers, and 7 clinical samples, and 82 Exophiala phaeomuriformis strains isolated from 32 dishwashers and 50 railway sleepers were included in the study. MG sensitivities and decolorization activities of the strains were tested by agar dilution method. Decolorization activities of all Exophiala strains were investigated spectrophotometrically in broth medium containing 32 µg/mL MG.

**Results:** In both Exophiala species, the MG  $MIK_{90}$  values were found to be 128 µg/mL by the agar dilution method. On unaided visual evaluation, the best decolorization activity was seen in  $\geq 32$  µg/mL MG concentration. There was no difference in decolorization rates of MG between Exophiala species in agar based-medium tests ( $p>0.05$ ). In comparison of the spectrophotometrically performed decolorization activities, no difference was found between Exophiala species and isolation regions ( $p>0.05$ ). Among all strains, an E. dermatitidis strain isolated from a dishwasher showed the highest decolorization ratio as 62.6%.

**Conclusion:** The decolorization potential of black yeasts such as Exophiala species and its applicability in the biodegradation of toxic dyes in environments should be further investigated.

**Keywords:** Black yeast, biodegradation, decolorization, Exophiala, malachite green

**Alındığı tarih:** 04.02.2018

**Kabul tarihi:** 30.04.2018

<sup>§</sup> Bu araştırma 37.Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya) sunulmuştur.

## Yazarların ORCID bilgileri:

Mustafa Şengül 0000-0003-2271-2618 Çağrı Ergin 0000-0001-7783-8723 Engin Kaplan 0000-0001-5705-717X  
Levent Aksoy 0000-0003-2297-9013 Macit İlit 0000-0002-1174-4182 G Sybren de Hoog 0000-0002-5344-257X

## GİRİŞ

Malaşit yeşili (MY) tekstil endüstrisi başta olmak üzere kültür balıkçılığı ve mikrobiyolojide yoğun olarak kullanılan sentetik N-metillenmiş-diaminotrifenilmetan bir boyadır. Laboratuvar ortamında yaygın olarak, mikobakterilerin izolasyonu, spor boyaması ve pH indikatörü olarak kullanılır<sup>(1-4)</sup>. Ayrıca fotodinamik tedavi için fotosensitizer etkisi de bildirilmiştir<sup>(5)</sup>. İnsanda toksik, karsinojen, mutajen ve teratojen etkileri nedeni ile Avrupa Birliği ülkelerinin yanı sıra diğer birçok ülkede de sağlığa zararlı kimyasal olarak kabul edilmektedir<sup>(1,2,6-8)</sup>.

MY'nin renginin farklı etkenler ile açılması, çoğunlukla kimyasal yapısının yıkımını göstermektedir. Literatürde tanımlandığı şekilde birçok yolla (biyolojik, fotokatalitik, fotoooksidatif, günışığı, koagülasyon-flokülasyon, ozonasyon, fenton re-ajanı, solvent ekstraksiyonu, sonokimyasal ve sonokatalitik) yıkılarak renksiz bileşiklere dönüştürülmektedir<sup>(3)</sup>. Ortaya çıkan yıkım ürünlerinin sağlığa zararlı etkileri daha azdır. Tüm yöntemlerin belirli bir etkinliği, avantajı/dezavantajı ve maliyeti bulunmaktadır. Ticari balıkçılık ortamlarında ve sanayinin atıklarında bulunan kimyasal boyaların renksizleştirilmesi, dolayısıyla sağlığa zararlı etkilerinin minimize edilmesinde, bakteri ve mantar kökenleri aracılı biyo-yıkım yapılabileceği belirtilmektedir<sup>(3,8-17)</sup>. MY'nin çevresel ortamdan temizlenmesinde doğal veya yapay aktif karbon bileşikleri, kil toprak yapılar, biyopolimerler ve bataklık turba toprağı da bulunmaktadır<sup>(3)</sup>. MY'nin biyolojik etkenler ile renksizleştirilmesi, temel olarak boyaların enzimler ile redüksiyonu, aynı zamanda da N-demetilasyon reaksiyonları sonucu olduğu belirtilmektedir. N-demetilasyon reaksiyonları genellikle mantarların çevresel-odun yapı ortamlarında kolonizasyonuna yardımcı olan lignin peroksidadz tarafından da katalizlenebilmektedir<sup>(15-17)</sup>.

*Exophiala* cinsi esmer mantarların, monoaromatik yapıli karbonik bileşikler için potent biyoyıkım özellikleri bulunduğunu ve özellikle sanayi ortamlarında, örneğin stirenin ortamdaki uzaklaştırılması gibi çevresel kazanımlar oluşturmada yararlı olabileceği gösterilmiştir<sup>(18-21)</sup>. Ülkemizde *Exophiala* türlerinin çevresel ortamlarda varlığına ilişkin araştırmalarda, petrol türevleri ile kirlenmiş ortamlardan (özellikle meşe ağacından yapılan demiryolu traversleri)<sup>(22)</sup>, bulaşık makinelerinden<sup>(23)</sup>, toprak<sup>(24-27)</sup> ve gıdalar<sup>(27)</sup> gibi farklı ortamlardan izolasyonlar bildirilmiştir.

Sunulan araştırmada, klinik ve insan yapımı çevresel ortamlardan sıklıkla izole edilen *Exophiala* kökenlerinin MY'yi renksizleştirme etkisi ve bu etkinin olası MY parçalanması ile ilişkisi araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Çalışma izolatları

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji Bilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önce yapılan araştırmalarda ülkemizden izole edilen ve ITS sekans analizi ile identifikasyonu ve genotiplendirmesi yapılan 102 *Exophiala dermatitidis* ve 82 *E. phaeomuriformis* kökeni çalışmaya alındı<sup>(22,23)</sup>. Ayrıca, Westerdijk Mantar Biyoçeşitlilik Enstitüsü (Utrecht, Hollanda) kültür koleksiyonundan elde edilen 7 klinik izolat da araştırmaya dâhil edildi (Tablo 1).

Kökenlerin renksizleştirme aktivitesini incelemek için araştırma; MY direncinin saptanması ve renksizleştirme oranının belirlenmesi olmak üzere iki aşamada yapıldı.

### Seçilmiş *Exophiala* kökenlerinde MY direncinin araştırılması

Çalışmada kullanılan kökenler stok ortamların-

dan çıkarılarak Sabouraud'un dekstrozu agar (SDA, HiMedia, Hindistan) besiyerinde 37°C'da beş gün süre ile kültüre edilerek canlandırıldı. Tüm kökenler arasından rastgele seçilen 44 (21 *E. dermatitidis*, 23 *E. phaeomuriformis*) kökenin MY direnci araştırıldı. Steril serum fizyolojik içinde süspanse edilen mayalar, Thoma lamında sayılarak 10<sup>6</sup> cfu/ml yoğunluğa ayarlandı. SDA besiyeri içinde MY konsantrasyonu 256-0.06 µg/ml aralığında olacak şekilde seri agar dilüsyon besiyerleri hazırlandı. Besiyeri pH'sı 6.5±0.2 olarak ayarlandıktan sonra, 121°C'da 15 dakika süre ile otoklavda steril edilerek petri plaklarına 4 mm kalınlıkta döküldü. Her maya süspanسیونundan, farklı konsantrasyondaki plaklara 15 µl spot ekim yapıldı. Besiyerleri, aerob koşullarda, 30°C'deki nemli ortamda inkübe edildi. Ekimler üçer günlük kontrollerle dokuz gün boyunca değerlendirildi. Çıplak göz ile koloni varlığı değerlendirildi. Kökenlerin kontrol ekimleri eşzamanlı olarak SDA besiyerine yapıldı.

### Renksizleştirme oranının spektrofotometrik ölçümü

Tablo 1'de dağılımı verilen kökenler, mayaözütü-pepton-dektroz (YÖPD; %1 maya özütü, %2 pepton, %2 dekstrozu) besiyerinde çoğaltıldı. Seçilmiş *Exophiala* kökenlerinde saptanmış olan direnç profiline göre, mayaların MY'nin renksizleştirme aktivitesi 32 µg/mL MY konsantrasyonunda araştırıldı. İçinde 32 µg/mL MY içeren YÖPD besiyerlerine yapılan ekimler, oda ısısının

da 48 saat inkübe edildi. Her köken, düz taban mikrotitrasyon plağındaki (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) farklı üç kuyucuğa 250'şer µL aktararak, 630 nm'de spektrofotometrik (BioTek ELx808, ABD) olarak değerlendirildi. Kontrol besiyerine ekim yapılmadı ancak süre sonunda aynı işlem bu besiyeri için de yinelendi. Spektrofotometrik olarak ölçümü yapılan mikrotitrasyon plakları bir hafta süre ile aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, her kuyucuktan SDA besiyerine üreme kontrolü ekimi yapıldı. Üreme görülen kökenlerin 32 µg/mL MY konsantrasyonuna dirençli olduğu kabul edilerek, bu kökenlere ait spektrofotometrik veriler istatistiksel analize alındı.

MY renksizleştirme oranı:

$$(\%) \text{Renksizleştirme} = \frac{(\text{Kontrol Malaşit Yeşili}_{OD650} - \text{Test Malaşit Yeşili}_{OD650})}{\text{Kontrol Malaşit Yeşili}_{OD650}} \times 100$$

formülüne göre hesaplandı.

### İstatistik değerlendirme

Minitab 16.0 (Köln, Almanya) programı ile yapıldı ve hata payı %5 (p<0.05 değeri anlamlı) olarak kabul edildi.

### BULGULAR

Araştırmaya alınan rastgele seçilmiş *Exophiala* kökenlerinde MIK<sub>90</sub> değeri 128 µg/mL olarak bulundu (Tablo 2). Her iki tür için de MIK<sub>90</sub> değeri 128 µg/mL olarak saptandı.

Tablo 1. Çalışmaya alınan tüm kökenlerin dağılımı (N=191).

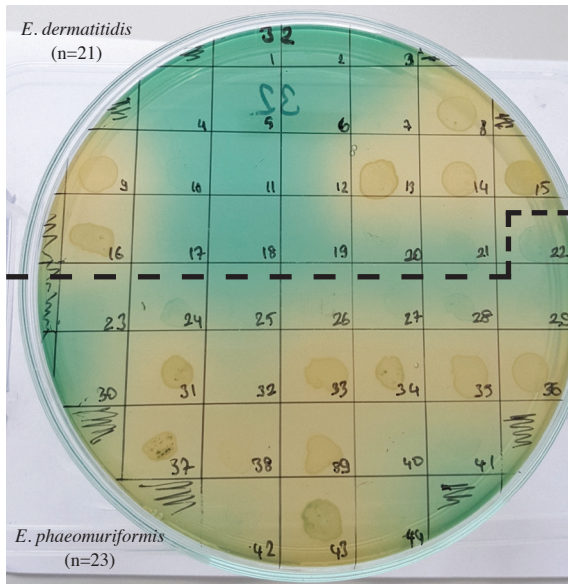
|                  | <i>Exophiala dermatitidis</i> |               | <i>Exophiala phaeomuriformis</i> |               |
|------------------|-------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
|                  | Referans                      | Referans-dışı | Referans                         | Referans-dışı |
| Çevresel         |                               |               |                                  |               |
| Bulaşık makinesi | 17                            | 52            | 7                                | 25            |
| Demiryolu        | 3                             | 30            | 2                                | 48            |
| Klinik           | 7                             | —             | —                                | —             |
| Toplam           |                               | 109           |                                  | 82            |

Referans: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)'a kayıtlı köken

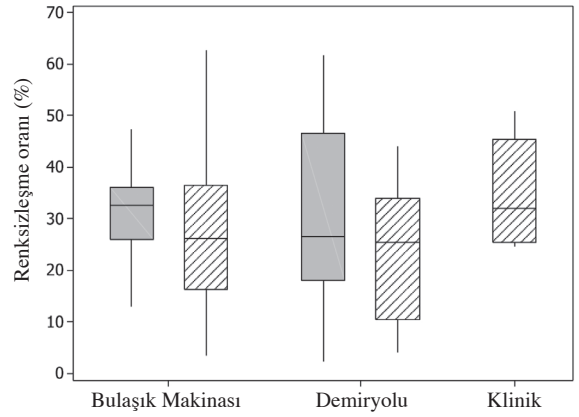


Tablo 2. Rastgele seçilmiş *Exophiala* (N=44) kökenlerinin inhibe olduğu en düşük malaşit yeşili konsantrasyonları.

| Malaşit Yeşili konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ ) | <i>Exophiala dermatitidis</i> (n=21) | <i>Exophiala phaeomuriformis</i> (n=23) | Toplam inhibisyon (n, %) |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| $\leq 1$                                           | -                                    | -                                       | 0 (0.0)                  |
| 2                                                  | 6                                    | 6                                       | 12 (27.2)                |
| 4                                                  | 8                                    | 3                                       | 23 (52.2)                |
| 8                                                  | -                                    | 2                                       | 25 (56.8)                |
| 16                                                 | -                                    | -                                       | 25 (56.8)                |
| 32                                                 | -                                    | -                                       | 25 (56.8)                |
| 64                                                 | -                                    | -                                       | 25 (56.8)                |
| $\geq 128$                                         | 7                                    | 12                                      | 100 (100.0)              |

Şekil 1. Malaşit yeşili (32  $\mu\text{L/mL}$ ) içeren SDA besiyerinde koloni çevrelerinde görülen renksizleştirme profilleri.

Rastgele seçilmiş *Exophiala* (n=44) kökenlerinin renksizleştirme aktivitelerinin çalışıldığı katı besiyeri incelendiğinde, MY'nin 32  $\mu\text{g/mL}$  ve üstündeki konsantrasyonlarında renksizleştirme aktivitesi göz ile değerlendirilebildi (Şekil 1). Renksizleştirme aktivitesi değerlendirilen kökenler arasında, yüksek MY konsantrasyonunda üreyebilen kökenlere karşı daha düşük konsantrasyonlarda (2-8  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibe olan kökenlerin de varlığı saptandı (Tablo 2). Katı besiyerinde renksizleştirme aktivitesinin iyi gözlemlendiği 32  $\mu\text{g/mL}$  MY konsantrasyonunda üreyebilen 19 izolatın 15'inde (%78.9) sınırları keskin olmayan "renk açılması/beyazlatma" görüldü (Tablo 2, Şekil 1). Test edilen 32  $\mu\text{g/mL}$

Şekil 2. Farklı kaynaklardan izole edilen *E. phaeomuriformis* (n=46; düz sütun) ve *E. dermatitidis* (n=68; çizgili sütun) kökenlerinin malaşit yeşilini renksizleştirme aktivitelerinin karşılaştırılması.

konsantrasyonda üreyebilen *E. dermatitidis* kökenlerinin 6'sının (%85.7) ve *E. phaeomuriformis* kökenlerinin 9'unun (%75.0) MY'yi renksizleştirdiği, türler arasında istatistiksel farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) bulundu.

Araştırmaya alınan tüm *Exophiala* (N=191) kökenlerinin 32  $\mu\text{g/mL}$  MY içeren YÖPD besiyerinden 48 saat inkübasyon sonrasında yapılan kontrol ekimlerinde; 68 *E. dermatitidis* (48 bulaşık makinası, 15 demiryolu traversi ve 5 klinik örnek) ve 46 *E. phaeomuriformis* (18 bulaşık makinesi ve 28 demiryolu traversi) kökeni olmak üzere toplam 114 köken üreme gösterdi. Bu *Exophiala* kökenlerindeki türler arasında, MY'yi

renksizleştirme oranları bakımından istatistiksel farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ). Aynı şekilde türlerin izolasyon bölgeleri (demiryolu traversi, bulaşık makinesi ve klinik kökenler) arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ , Şekil 2). Bununla birlikte, MY'yi en yüksek düzeyde renksizleştirme oranının (%62.6), bulaşık makinasından izole edilen bir *E. dermatitidis* kökeninde olduğu saptandı.

## TARTIŞMA

Avrupa Birliği verilerine göre kaçak olarak yaygın bir şekilde kullanılan MY, çevresel kirlenmeye de neden olmaktadır<sup>(3,7)</sup>. Günümüzde, bölgesel olarak ekonomide önemli yere sahip olan tekstil sektörünün ortaya çıkardığı en önemli sorunlardan biri de, tekstil boyama çukurları kaynaklı atık sulardır. Bu atık sularda polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ağır metal iyonları, surfaktanlar, boyalar, çözücüler ve deterjanlar bulunmaktadır<sup>(8)</sup>. Her ne kadar gıda sektöründe kullanılan MY ve türevleri, endüstriyel atık olan sulardaki MY konsantrasyonlarına ulaşmıyorsa da, gıda ile doğrudan insana geçiş söz konusudur<sup>(1,2,7)</sup>. Bu nedenle, çevresel MY'nin yıkımına yönelik yeni araştırmalar sürekli gündemdedir<sup>(3)</sup>. *Exophiala* kökenleri benzer çevresel kirliliğin olduğu bölgelerde kolaylıkla çoğalabildiği bilinmektedir. Farklı aromatik bileşiklerin bulunduğu ortamda çoğalabilen *Exophiala* türleri, bu çevresel kirleticilerin biyo-yıkımlarında rol alabilirler<sup>(18-21)</sup>. MY klorid veya oksalat tuzları (kromatik) şeklinde olabildiği gibi nötral karbinol veya indirgenmiş löko formunda da bulunabilir. MY olarak anılan yeşili, akril parlak yeşil, benzaldehit yeşili vb. gibi çok sayıda benzer yapıda boyar maddeler vardır. MY, biyolojik bilimlerde okside formda ["Chemical Abstract Services" (CAS) numarası 2437-29-8, renk indeksi (CI) 42000] kullanılır<sup>(1)</sup>.

Toksik ve karsinogenetik etkisi olan MY, çevresel bakteriler ve özellikle intestinal flora tarafın-

dan yapısal olarak farklılaştırılarak renksiz formlarına dönüştürülmektedir<sup>(1,28)</sup>. MY'nin ortamda renk kaybı kimyasal yapı dönüşümünün bir göstergesidir. Ortaya çıkan yıkım ürünleri, MY'nin biyolojik etkileşimlerini (lipoprotein yapıya bağlanma, DNA ile interkalasyon vb.) göstermez. Özellikle mikobakterilerin izolasyonunda yoğun olarak kullanılan MY'nin, indirgendiği formda antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin önemli oranda azaldığı gösterilmiştir<sup>(2,13,29,30)</sup>. Yapılan çalışmalarda, MY'nin biyoyıkımlarında, lökomalaşit başta olmak üzere, birçok farklı yapıdaki bileşiğe yıkıldığı görülmüştür<sup>(9-11,13-16,29,30)</sup>.

*Exophiala* türlerinin insanlarda özellikle immünsüpresyon varlığında yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturmaları nedeni ile çevresel kolonizasyon bölgeleri risk faktörü olarak araştırılmaktadır. Virülans özelliklerinin morfogenez ile ilişkili olduğu, besin ortamının az ve toksik olduğu sıra dışı ortamların virülansı etkilediği belirtilmiştir<sup>(32)</sup>. Malaşit yeşili, balık yetiştirme ortamlarında bulunan fungal ve parazitik enfeksiyon etkenlerine karşı sıvı ortama doğrudan verilir. Özellikle kültür balıkçılığında, inkübas-yondaki balık yumurtalarının oomiçet mantarların aşırı çoğalmasını önlemede, bazı balık türlerinin sistemik hastalıklarının tedavisinde ve yetiştirme ortamlarının dezenfeksiyonunda etkindir<sup>(2,7)</sup>. Gıdada yüksek kullanım ve boya sanayi atıkları nedeni ile MY ile çevresel kirlilik yüksektir.

Sunulan araştırmada, özellikle hidrokarbon ile kirlenmiş ortamlara kolaylıkla kolonize olabilen *Exophiala* cinsinin insan patojeni olan iki türünde de MY'yi renksizleştirme etkisi saptanmıştır. Ulaşılabilen literatürde, genellikle MY'yi renksizleştirme etkisi bulunan tek kökenin mikrobiyolojik ve biyoteknolojik özelliklerinin ön planda incelenmektedir. Genellikle bu kökenler yüksek MY renksizleştirme aktiviteleri gösterirler ve çevresel biyo-iyileştirme açısından önemlidir<sup>(13-</sup>

<sup>17)</sup>. *Exophiala* kökenlerinin toksik sanayi atıklarında kolonize olabilmesi, insan sağlığına zararlı MY'nin yapısını değiştirmesi nedeni ile önemlidir. *Exophiala* cinsinin de içinde yer aldığı *Chaetothyriales* takımının doğada odunsu yapılarda kolonizasyonunu kolaylaştıran ligninolitik enzimleri, aynı zamanda polisiklik aromatik hidrokarbonların yıkımlarını sağlayan mikrobiyal enzim gruplarından<sup>(20)</sup>. Bununla birlikte, sunulan araştırmada odunsu yapıların bulunmadığı bulaşık makinelerinden izole edilen kökenler ile travers gibi katran ile karşılaşan odun yapıdan izole edilen demiryolu kökenli izolatlara MY yıkım kapasiteleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 2). Sunulan araştırmada en yüksek renksizleştirme oranı ise bulaşık makinasından izole edilen bir *E. dermatitidis* kökeninde %62.6 olarak bulunmuştur. Bu durum, hipotetik olarak, *Exophiala* cinsinde, ligninolitik enzimlerin dışında farklı biyoyıkım mekanizmalarının aktif olarak etkili olabileceğini göstermektedir.

Birçok mikrobiyal yapı belirli bir oranda MY'yi yıkabilmektedir. Yüksek biyo-yıkım kapasitesi ne sahip kökenler genellikle daha ileri araştırmalar kapsamında, endüstriyel biyoyıkımdaki ekonomik ve çevresel kazanımlar açısından incelenmektedir. Bu nedenle, ülkemizde çevresel ortamlardan izole edilen esmer mantar kökenlerinin, çevresel kirleticilerin biyo-yıkım potansiyelleri açısından araştırılması önem göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Culp SJ, Beland FA. Malachite green: A toxicological review. *Int J Toxicol*. 1996;15(3):219-38. <https://doi.org/10.3109/10915819609008715>
- Alderman DJ. Malachite green: a review. *J Fish Dis*. 1985;8(3):289-98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb00945.x>
- Raval NP, Shah PU, Shah NK. Malachite green "a cationic dye" and its removal from aqueous solution by adsorption. *Appl Water Sci*. 2017;7(7):3407-45. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0512-2>
- Banaei N, Kincaid EZ, Lin SY, Desmond E, Jacobs WR Jr, Ernst JD. Lipoprotein processing is essential for resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to malachite green. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3799-802. <https://doi.org/10.1128/AAC.00647-09>
- Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2010;25(3):385-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-009-0706-z>
- Council Regulation 2377/90/EEC. *Off J Eur Commun* 1990; L224.
- Olesen PT. Risk assessment of malachite green in food. National Food Institute, Technical University of Denmark, Soeborg, Danimarka, 2007.
- Ning XA, Liang JY, Li RJ, et al. Aromatic amine contents, component distributions and risk assessment in sludge from 10 textile-dyeing plants. *Chemosphere*. 2015;134:367-73. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.015>
- Ali H. Biodegradation of synthetic dyes – a review. *Water Air Soil Pollut*. 2010;213(1-4):251-73. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0382-4>
- Cheriaa J, Khairredine M, Rouabhia M, Bakhrouf A. Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium. *Sci World J*. 2012; 2012:512454. <https://doi.org/10.1100/2012/512454>
- Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresour Technol*. 1996;58(3):217-27. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00113-7)
- Fu Y, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresour Technol*. 2001;79(3):251-62. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00028-1)
- Chen CH, Chang CF, Liu SM. Partial degradation mechanisms of malachite green and methyl violet B by *Shewanella decolorationis* NT0U1 under anaerobic conditions. *J Hazard Mater*. 2010;177(1-3):281-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.030>
- Parshetti G, Kalme S, Saratale G, Govindwar S. Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chim Slov*. 2006;53:492-8.
- Jadhav JP, Govindwar SP. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast*. 2006;23(4):315-23. <https://doi.org/10.1002/yea.1356>
- Deivasigamani C, Das N. Biodegradation of basic violet 3 by *Candida krusei* isolated from textile wastewater. *Biodegradation*. 2011;22(6):1169-80. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9472-2>
- Cha C, Doerge DR, Cerniglia CE. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(9):4353-60. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4358-4360.2001>
- Cox HH, Moerman RE, Van Baalen S, van Heyningen WJM, Doddema HJ, Harder W. Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. *Biotechnol Bioeng*. 1997;53(3):259-66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970205\)53:3<259::AID-BIT3>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970205)53:3<259::AID-BIT3>3.0.CO;2-H)
- Prenafeta-Boldu' FX, Summerbell R, de Hoog GS. Fungi growing on aromatic hydrocarbons:

- biotechnology's unexpected encounter with biohazard. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(1):109-30.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x>
20. Blasi B, Poyntner C, Rudavsky T, Prenafeta-Boldú FX, de Hoog GS, Tafer H, Sterflinger K. Pathogenic yet environmentally friendly? Black fungal candidates for bioremediation of pollutants. Geomicrobiol J. 2016;33(3-4):308-17.  
<https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1052118>
21. Isola D, Selbmann L, de Hoog GS, et al. Isolation and screening of black fungi as degraders of volatile aromatic hydrocarbons. Mycopathologia. 2013;175(5-6):369-79.  
<https://doi.org/10.1007/s11046-013-9635-2>
22. Gümrall R, Tümgör A, Saraçlı MA, Yıldırım ŞT, İlkit M, de Hoog GS. Black yeast diversity on creosoted railway sleepers changes with ambient climatic conditions. Microb Ecol. 2014;68(4):699-707.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-014-0459-5>
23. Döğen A, Kaplan E, Oksüz Z, Serin MS, İlkit M, de Hoog GS. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol. 2013;51(5):493-8.  
<https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738313>
24. Göçmen H, Özkan VK. A research on the microfungial flora of some greenhouse soils in the vicinity of Lapseki Canakkale, Turkey. Mycopathologia. 2002;153(2):103-12.
25. Sert H, Akdeniz F. Turizmin vazgeçilmez arkeolojik eserlerde fungal korozyon: Phaselis örneği. Phaselis. 2017;3:73-80.  
<https://doi.org/10.18367/Pha.17004>
26. Ergin Ç, Kaleli İ, Mete E. Turistik kaya mezarlarının iç ortam havasında küf mantarlarının dağılımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2009;39(3-4):103-7.
27. Yılmaz SÖ. Identification of microflora in butter samples from Turkey by using microbial identification system. Asian J Chem. 2009;21(4):3257-62.
28. Henderson AL, Schmitt TC, Heinze TM, Cerniglia CE. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. Appl Environ Microbiol. 1997;63(10):4099-101.
29. Jones JJ, Falkinham JO 3rd. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(7):2323-6.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2323-2326.2003>
30. Hu Y, Yu X, Zhao D, Li R, Liu Y, Ge M, Hu H. Isolation of nontuberculous mycobacteria from soil using Middlebrook 7H10 agar with increased malachite green concentration. AMB Express. 2017;7:69.  
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0373-6>
31. Sav H, Ozakkas F, Altınbaş R, et al. Virulence markers of opportunistic black yeast in *Exophiala*. Mycoses. 2016;59(6):343-50.  
<https://doi.org/10.1111/myc.12478>

# İnsülin, Norepinefrin ve Östradiolün Çeşitli Mikroorganizmaların Üremesi Üzerine Etkisi§

Defne GÜMÜŞ\*<sup>®</sup>, Fatma KALAYCI YÜKSEK\*<sup>®</sup>, Gülşen UZ\*\*<sup>®</sup>, Merve BİLGİN\*\*\*<sup>®</sup>, Mine ANĞ KÜÇÜKER\*<sup>®</sup>

\*İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

\*\*İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

\*\*\*İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

## ÖZ

**Amaç:** Konağa yerleşen mikroorganizmaların üremeleri, virulans ve antibiyotiklere duyarlılık da dâhil olmak üzere tüm özellikleri konak koşulları tarafından kontrol edilir. Çalışmamızda, bir konak faktörü olarak östradiol, insülin ve norepinefrinin farklı mikroorganizmaların (Üropatojen *Escherichia coli* C7, *Candida albicans* SC5314, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üremesi üzerine etkilerinin in vitro olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu amaçla, mikroorganizmalar hormonların farklı konsantrasyonlarını içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerlerinde (Triptik soy buyyon ve Sabouraud dekstrozu buyyon) üretilmişlerdir. Mikroorganizmaların üremeleri spektrofotometre ile 4., 6. ve 24. saatlerde ölçülerek belirlenmiştir. Üremelerin istatistiksel değerlendirilmesinde çift yönlü ANOVA Bonferroni post-test kullanılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmamızda denenen tüm hormon konsantrasyonlarının 6 saat inkübasyon sonunda *E. faecalis* üremesini kontrol besiyerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde baskıladığı, *C. albicans* üremesinin hormon ilave edilen besiyerlerinde 24 saat inkübasyonda anlamlı şekilde değiştiği (200 µU/mL insülin ve 20 pg/mL östradiolda azalma; 150 pg/mL ve 400 pg/mL östradiol ile 1.700 pg/mL, 7.500 pg/mL ve 40.000 pg/mL norepinefrinle artma) belirlenmiştir. Buna karşın denenen hormonların MRSA, *P. aeruginosa* ve UPEC suşlarının üremesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Memeli hormonlarının mikroorganizmaların davranışları üzerinde de etkilerinin gösterilmesi ile konakta çevresel bir unsur olarak enfeksiyon patogenezini belirledikleri vurgulanmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ile farklı konsantrasyonlardaki hormonların mikroorganizmaların üremelerinde çeşitli etkilere sahip olduğu desteklenmektedir. Bu ve benzeri çalışmalar, hormonların insanda enfeksiyon sürecini doğrudan belirlediğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Inter-kingdom haberleşme, insülin, östradiol, norepinefrin, üreme

## ABSTRACT

**Effects of Insulin, Norepinephrine and Estradiol on Growth of Different Microorganisms**

**Objective:** All characteristics of microorganisms colonized in host including their growth, virulence and antibiotic susceptibilities are controlled by host conditions. In our study, it has been aimed to determine the effects of estradiol, insulin, norepinephrine as host factors on the growth of various microorganisms (uropathogenic *Escherichia coli* C7, *Candida albicans* SC5314, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) in vitro setting.

**Material and Methods:** For this purpose, microorganisms were grown in different culture media (Tryptic Soy Broth and Sabouraud Dextrose Broth) supplemented with/without various concentrations of hormones. Growths of microorganisms were measured at 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours using a spectrophotometer. Statistical analysis of growths were determined by using two-way ANOVA Bonferroni post-test.

**Results:** All hormone concentrations were shown to suppress the growth of *E. faecalis* significantly after 6 hours of incubation. The growth of *C. albicans* was found to be significantly altered (reduced in the presence of 200 µU/mL insulin and 20 pg/mL estradiol; increased in the presence of 150 pg/mL and 400 pg/mL estradiol & 1700 pg/mL, 7500 pg/mL and 40000 pg/mL norepinephrine) in the presence of different hormones. However, hormones tested were shown to exert no effect on the growth of MRSA, *P. aeruginosa* and UPEC ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** With demonstration of the effects of mammalian hormones also on the behaviour of microorganisms, it has been emphasized that they determine the pathogenicity of infectious diseases as an environmental factor. Our results have supported that, different concentrations of hormones have various effects on growth of microorganisms. All these, and similar studies have showed that, hormones determine the infectious process directly in human beings.

**Keywords:** Inter-kingdom communication, insulin, estradiol, norepinephrine, growth

Alındığı tarih: 09.01.2018

Kabul tarihi: 15.05.2018

§ Bu araştırma 10. Balkan Mikrobiyoloji Kongresi'nde (16-18 Kasım 2017, Sofya, Bulgaristan) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

## Yazarların ORCID bilgileri:

Defne Gümüş 0000-0003-4070-6924 Fatma Kalaycı Yüksek 0000-0002-0028-5646 Gülşen Uz 0000-0001-9895-5187  
Merve Bilgin 0000-0002-7734-8553 Mine Anğ Küçüker 0000-0002-4809-3985



## GİRİŞ

Bir bakteri konak organizmayı enfekte ettiğinde, içinde bulunduğu çevre artık konak ve konağın tüm unsurlarıdır. Konağa (insan) yerleşmiş olan mikroorganizmaların virülans ve antibiyotiklere duyarlılıkları da dâhil olmak üzere tüm özellikleri işte bu çevre yani konak koşulları tarafından düzenlenmektedir<sup>(1-3)</sup>. Bu düzenlenmede rol oynayan, pek çoğu sinyal molekülü olarak görev yapan konak faktörü vardır. Son yıllarda yapılan araştırmalar da, konak hormonlarının önemini vurgulamakta olup, bilinenin aksine hormonların konağın yalnızca kendi hücreleri (memeli veya bitki hücreleri) arasındaki iletişimde değil, “konak-mikrop” iletişiminde de rol oynadığını belirtmektedirler. Bu da mikroorganizmalar ile konağı olan canlıların birlikte evrimini (koevrimini) açıklamaktadır. Öte yandan prokaryot hücreler kimyasal bir iletişim biçimi olan “quorum sensing” (QS; yoğunluğu algılama) molekülleri (otoindükleyici olarak bilinen moleküller) ile çevreyi algılar, iletişim kurar ve davranışlarını düzenlerler<sup>(4-8)</sup>. Ökaryot hormonlarının bu süreçte otoindükleyici olarak davranarak hem mikroorganizmaların kendi aralarında hem de mikroorganizma ile memeli hücreleri arasındaki iletişimi sağladıkları gösterilmiştir. Bu, “âlemlerarası” (interkingdom) bir sinyal iletimidir ve bakterilerle konakları arasında simbiyotik ve patojenik ilişkilere de aracılık etmektedir<sup>(9,10)</sup>.

Memeliler gibi kimi mikroorganizmaların da hormon üretmesi, memeli hormonlarını tanıyan reseptörleri taşımaları ve hormonların memeli-mikrop ilişkisinde sinyal molekülü olarak rol oynadığının gösterilmesi ile “Mikrobiyal Endokrinoloji” olarak adlandırılan yeni bir araştırma alanı doğmuştur. *Escherichia coli*’de insülin, *Tetrahymena pyriformis*’te kortikotropin, *Bacillus subtilis* ve *Plasmodium falciparum*’da somatostatin, *Trychophyton mentagrophytes*’de progesteron; *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans*

ve *Pseudomonas aeruginosa*’da östradiol ile ilgili reseptörlerin varlığı gösterilmiştir<sup>(11-19)</sup>.

Mikrobiyal endokrinoloji araştırmaları, genel olarak, bakterilerle stres hormonları olarak bilinen katekolaminler [epinefrin (E), norepinefrin (NE) ve dopamin (D)] arasındaki ilişkiye odaklanmışsa da kimi araştırmacılar diğer bazı hormonları da [östradiol (Ö), insülin (İ), progesteron (P), testosteron (T) gibi] çalışma konusu edinmişlerdir<sup>(20-27)</sup>.

Biz de çalışmamızda, metabolizmamızın farklı süreçlerinde önemli rolleri olan insülin, norepinefrin ve östradiolün farklı mikroorganizmaların üremesi üzerine etkilerini in vitro olarak belirlemeyi amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Suşlar:** Bu çalışmada, standart üropatojen *Escherichia coli* (UPEC) C7, *Candida albicans* SC5314, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır. Tüm suşlar -80°C’de saklanmışlardır.

**Hormonlar:** Çalışmada kullanılan hormonlar ve konsantrasyonları sağlıklı bir insanın kan ve idrarındaki fizyolojik konsantrasyonları göz önünde bulundurularak aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

İnsülin (20 µU/mL ve 200 µU/mL), norepinefrin (100 pg/mL, 500 pg/mL, 1.700 pg/mL, 7.500 pg/mL ve 40.000 pg/mL) ve östradiol (20 pg/mL, 150 pg/mL ve 400 pg/mL)<sup>(28-31)</sup>.

**Üremelerin saptanması:** Farklı koşulların suşların üremelerine (üremede artma veya azalma) etkisi turbidimetrik yöntem ile araştırılmıştır<sup>(32)</sup>. Son hacim 9 mL olacak şekilde yukarıda belirtilen farklı konsantrasyonlarda hormon içeren ve

hormon içermeyen (kontrol) triptik soya buyyon (TSB) besiyerlerine ekim yapılmıştır. *C. albicans* için besiyeri olarak Sabouraud dekstrozu buyyon (SDB) kullanılmıştır. Tüm bakteriler için başlangıç konsantrasyonu  $10^7$  CFU/mL, *C. albicans* için ise  $10^5$  CFU/mL olacak şekilde süspansiyonlar hazırlanmış, ekim yapılmış ve besiyerleri  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümleri spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific, Finlandiya) 600 nm dalga boyunda 4., 6. ve 24. saatlerde yapılmış ve deneyler her suş için ikişer kez yinelenmiştir.

**İstatistiksel analizler:** İki'den fazla grup arası değerlendirmede çift yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) kullanılmıştır. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığının saptanması Bonferroni post-test ile yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p<0.05$  olarak değerlendirilmiştir.

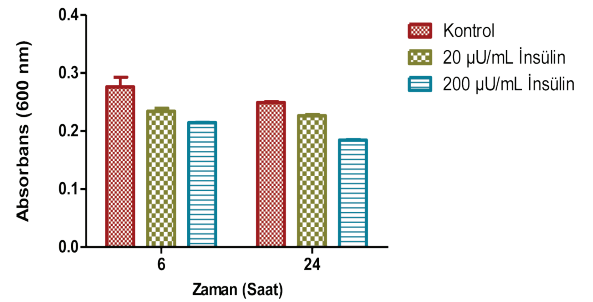
## BULGULAR

Mikroorganizmaların üremeleri üzerine çeşitli hormonların etkisi ve ilgili konsantrasyonlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Denenen tüm hormonların 4 saat inkübasyon süresinde hiçbir mikroorganizmanın üremesi üzerine etkisi görülmemiştir. Üç hormona ait tüm konsantrasyonların MRSA, UPEC ve *P. aeruginosa* suşlarının üremeleri üzerine anlamlı bir etkisi saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

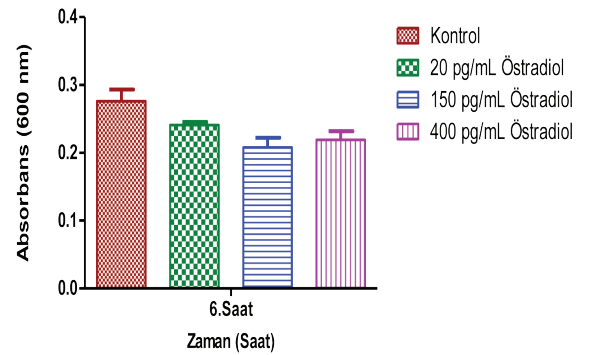
### *Enterococcus faecalis* üreme sonuçları

Üç hormonun da tüm konsantrasyonları *E. faecalis* suşunun üremesini anlamlı derece azaltarak etki göstermiştir. Besiyerine 20  $\mu\text{U/mL}$  insülin ilavesi, kontrole göre 6. saatte ( $p<0.001$ ) ve 24. saatte ( $p<0.05$ ) üremeyi anlamlı oranda azaltmış; 200  $\mu\text{U/mL}$  insülin konsantrasyonu da hormon içermeyen besiyerine göre 6. ve 24. saatlerde üremeyi ileri derecede anlamlı olarak azaltmıştır ( $p<0.001$ ). Hem östradiol hem de norepinefrin üreme üzerine 6. saatte anlamlı etkiler

göstermiştir. Bu etkiler, östradiol için 20  $\text{pg/mL}$  konsantrasyonda, üremeyi anlamlı derecede baskılama şeklinde iken ( $p<0.05$ ) 150  $\text{pg/mL}$  ve 400  $\text{pg/mL}$  konsantrasyonda, kontrole göre ileri derecede anlamlı baskılama olarak belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Norepinefrinin tüm konsantrasyonları, enterokok suşunun üremesini 6 saat inkübasyonda farklı seviyelerde anlamlı derecede (100  $\text{pg NE}$ ,  $p<0.001$ ; 500  $\text{pg NE}$ ,  $p<0.01$ ; 1.700  $\text{pg NE}$ ,  $p<0.001$ ; 7.500  $\text{pg NE}$ ,  $p<0.01$ ; 40.000  $\text{pg NE}$ ,  $p<0.05$ ) baskılamıştır.



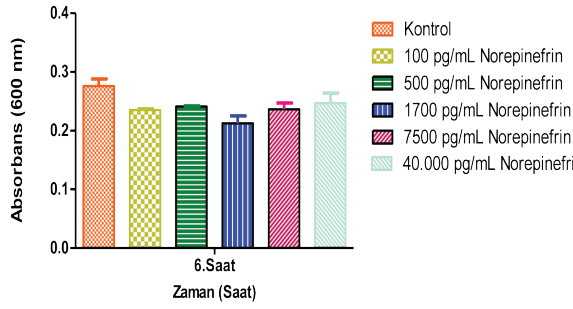
**Grafik 1.** Farklı insülin konsantrasyonlarının *Enterococcus faecalis* suşunun üremesi üzerine etkisi. *E. faecalis* TSB (kontrol) TSB+20  $\mu\text{U/mL}$  insülin, TSB+200  $\mu\text{U/mL}$  insülin  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Veriler ortalama bulanıklık  $\pm$  standart sapmayı göstermektedir.



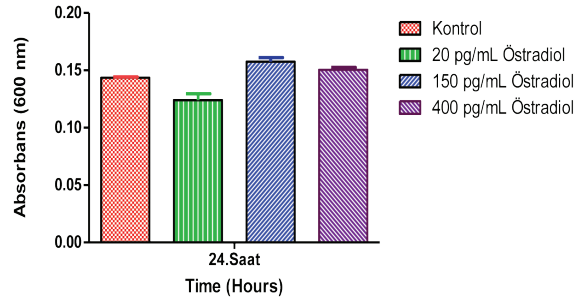
**Grafik 2.** Farklı östradiol konsantrasyonlarının *Enterococcus faecalis* suşunun üremesi üzerine etkisi. *E. faecalis* TSB (kontrol) TSB+20  $\text{pg/mL}$  östradiol, TSB+150  $\text{pg/mL}$  östradiol, TSB+400  $\text{pg/mL}$  östradiol  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Veriler ortalama bulanıklık  $\pm$  standart sapmayı göstermektedir.

### *Candida albicans* üreme sonuçları

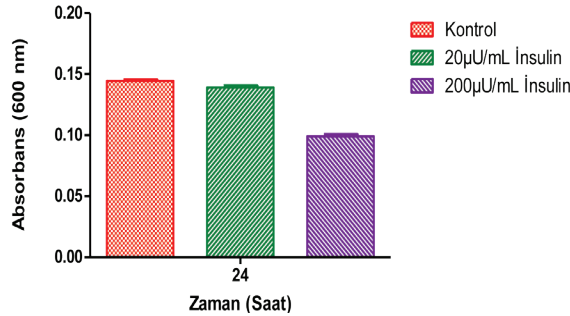
Denenen hormonların hiçbirinin 4. ve 6. saatlerde *C. albicans*'ın üremesi üzerine etkisi olmadı-



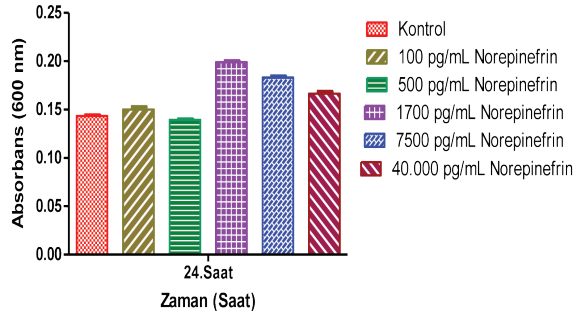
**Grafik 3.** Farklı norepinefrin konsantrasyonlarının *Enterococcus faecalis* suşunun üremesi üzerine etkisi. *E. faecalis* TSB (kontrol) TSB+ 100 pg/mL norepinefrin, TSB+500 pg/mL norepinefrin, TSB+1700 pg/mL norepinefrin, TSB+7500 pg/mL norepinefrin, 40.000 pg/mL norepinefrin 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Veriler ortalama bulanıklık  $\pm$  standart sapmayı göstermektedir.



**Grafik 5.** Farklı östradiol konsantrasyonlarının *Candida albicans* suşunun üremesi üzerine etkisi. *C. albicans* TSB (kontrol) TSB+20 pg/mL östradiol, TSB+150 pg/mL östradiol, TSB+400 pg/mL östradiol 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Veriler ortalama bulanıklık  $\pm$  standart sapmayı göstermektedir.



**Grafik 4.** Farklı insülin konsantrasyonlarının *Candida albicans* suşunun üremesi üzerine etkisi. *C. albicans* TSB (kontrol) TSB+20 µU/mL insülin, TSB+200 µU/mL insülin 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Veriler ortalama bulanıklık  $\pm$  standart sapmayı göstermektedir.



**Grafik 6.** Farklı norepinefrin konsantrasyonlarının *Candida albicans* suşunun üremesi üzerine etkisi. *C. albicans* TSB (kontrol) TSB+100pg/mL norepinefrin, TSB+500 pg/mL norepinefrin, TSB+1700 pg/mL norepinefrin, TSB+7500 pg/mL norepinefrin, 40.000 pg/mL norepinefrin 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Veriler ortalama bulanıklık  $\pm$  standart sapmayı göstermektedir.

ğı belirlenmiş ( $p>0.05$ ), bununla birlikte, 24. saatte insülinin 200 µU/mL'lik ve östradiolün 20 pg/mL'lik konsantrasyonlarının kontrole göre üremeyi ileri derecede azalttığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). 150 pg/mL östradiol ile 1.700 pg/mL, 7.500 pg/mL ve 40.000 pg/mL'lik NE konsantrasyonları *Candida* üremesini ileri anlamlı derecede artırırken ( $p<0.001$ ), 400 pg/mL östradiolün üremeyi anlamlı derecede artırdığı belirlenmiştir.

## TARTIşMA

Enfeksiyon durumunda mikroorganizma ile onun çevresi olan konağın çeşitli kimyasal sinyaller sayesinde çift yönlü bir iletişim içinde

olduğı ve konak hormonları ile QS moleküllerinin bu sinyal dilinin vazgeçilmez bileşenleri olduğı bilinmektedir. Mikrobiyal endokrinoloji alanında yapılan çalışmaların sonuçları sayesinde hormonların âlemler arası haberleşmedeki rollerini açıklayıcı veriler sağlanabilmektedir.

Yapılan in-vitro çalışmalarla hormonların mikroplar üzerinde etkileri olduğı gösterilmiştir. Bu alanda en sık üzerinde durulan katekolamin ve türevi hormonların demir iyonu alımını etkilediğı öne sürülmüştür. Araştırmacılar, bazı sidereforların katekol gruplarını içerdiğini ve katekolaminlerin demirin bağı bulunduğı transferrin ve laktoferrin gibi bileşiklerden alınması yoluyla etkili olduklarını belirtmişlerdir. Bu mekanizma-

Tablo 1. Hormonların mikroorganizmaların üremesi üzerine 6. ve 24. saatlerde etkileri.

| Mikroorganizmalar             | İnsülin (µU/mL)       |                     |                       |                       | Östradiol (pg/mL)   |                       |                       |                      | Norepinefrin (pg/mL)  |                      |                       |                       |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                               | 20                    | 200                 | 200                   | 200                   | 20                  | 150                   | 400                   | 4000                 | 100                   | 500                  | 1700                  | 7500                  |
| MRSA                          | -                     | -                   | -                     | -                     | -                   | -                     | -                     | -                    | -                     | -                    | -                     | -                     |
| UPEC                          | -                     | -                   | -                     | -                     | -                   | -                     | -                     | -                    | -                     | -                    | -                     | -                     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -                     | -                   | -                     | -                     | -                   | -                     | -                     | -                    | -                     | -                    | -                     | -                     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | ↓***<br>%20<br>±0.005 | ↓*<br>%10<br>±0.002 | ↓***<br>%30<br>±0.004 | ↓***<br>%30<br>±0.007 | ↓*<br>%13<br>±0.004 | ↓***<br>%25<br>±0.014 | ↓***<br>%21<br>±0.012 | -                    | ↓***<br>%15<br>±0.003 | ↓**<br>%12<br>±0.002 | ↓***<br>%23<br>±0.02  | ↓***<br>%12<br>±0.002 |
| <i>Candida albicans</i>       | -                     | -                   | -                     | ↓***<br>%31<br>±0.014 | -                   | ↓***<br>%14<br>±0.005 | -                     | ↑***<br>%5<br>±0.002 | -                     | -                    | ↑***<br>%38<br>±0.014 | ↑***<br>%26<br>±0.014 |

- Üremede bir değişiklik saptanmamıştır. ↓ Üreme azalma, ↑ Üremede artma, (\*\*\*) p<0.001; \*\* p<0.01; \* p<0.05)  
MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, UPEC: Üropatojen *Escherichia coli*

nın özellikle demirin az bulunduğu çevre şartlarında hücreye demir sağlamada etkili olduğu da bildirilmektedir. Diğer bir mekanizması ise, hormonların bakterilerin çoğalmalarını özendiren oto-indükleyici-3 (OI-3) molekülüne benzer özellikte olmaları ile etki göstermeleridir (3,11,24,33).

*E. coli* K12 suşu tarafından da üretilen insülin hormonunun tıpkı katekolaminler gibi QS molekülü (homoserin laktonlar (HSL), oto-indükleyici-2 (OI-2), OI-3) olarak davrandığı bildirilmiştir<sup>(11)</sup>. Cinsiyet hormonlarından olan progesteron ve östradiolün ise bazı bakterilerde (*Prevotella intermedius* ve *Bacterioides meloninogenicus* gibi) konsantrasyona bağlı olarak K vitamini gibi görev yaptığı ve bakterilerin üremelerini etkilediği gösterilmiştir<sup>(26,34)</sup>. Ayrıca çeşitli mayalar (*C. albicans* ve *P. brasiliensis*) ile yapılan çalışmalarda steroid bağlayan proteinlerin bu mikroorganizmalarda bulunduğu gösterilmesi, cinsiyet hormonlarının fizyolojik süreçlerde değişimlere aracılık etmesi şeklinde yorumlanmaktadır<sup>(19,25)</sup>.

Katekolaminlerin bakterilerin üremesi üzerine etkilerini araştıran Freestone ve ark.<sup>(7)</sup> NE'nin *E. faecalis*'in üremesi üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını bildirirken, Lyte ve ark.<sup>(34)</sup> *S. epidermidis* üremesinde anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini göstermiştir. Apan ve ark.<sup>(35)</sup>'nin çalışmalarından elde edilen sonuçlar, NE'nin *S. auerus*, *S. epidermidis* ve *C. albicans*'ın üremesinin baskılandığını göstermiştir. Lyte ve ark.<sup>(8)</sup>'nin EHEC O157:H7 suşu ile yaptıkları bir diğer çalışmalarında, üremenin 100.000 kat ve üstü arttığı ve Shiga toksin üretiminin de 160 kat arttığı bildirilmiştir. *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis* ve *B. bronchiseptica*, katekolaminler varlığında üremelerinde birkaç katlı anlamlı artışlar olduğu gösterilen diğer bakteriler olmuşlardır<sup>(7,36-39)</sup>. Farklı mikroorganizmalarla ve farklı hormon konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda suşa ve konsantrasyona

bağlı olarak farklı şekilde sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da, NE'nin 1.700 pg, 7.500 pg ve 40.000 pg'lık konsantrasyonlarının *C. albicans* üremesini arttırdığı, ancak 100 pg ve 500 pg'lık konsantrasyonlarının üremeyi baskıladığı belirlenmiştir. Test edilen tüm NE konsantrasyonlarının MRSA, *P. aeruginosa* ve UPEC C7'nin üremesini etkilemediği, *E. faecalis* üremesini ise baskıladığı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Yokoyama ve ark.<sup>(40)</sup>, östradiolün *Campylobacter rectus*'un üremesini indüklediğini bildirmişlerdir. Bunların aksine, bir diğer cinsiyet hormonu olan progesteronun *Neisseria gonorrhoeae* ve *N. meningitidis* üremesini inhibe ettiği bildirilmiştir<sup>(41)</sup>. Plotkin ve ark.<sup>(26)</sup>, *E. faecalis*'in üremesinin dihidrotestosteron (DHT) varlığında etkilenmediğini, dikloretilen (DDE), hidrokortizon ve deksametazon varlığında ise azaldığını belirtmişlerdir. Östradiol ile ökaryot mikroorganizmalar üzerinde yapılan çalışmalardan da ilginç sonuçlar elde edilmiştir. *Trichopyton purpureum* ile enfekte tavşanlarda topikal  $\alpha$ -östradiolün enfeksiyonu geriletmediği gösterilmiştir. 17- $\beta$  östradiolün, konsantrasyona bağlı olarak *Microsporum canis* ve *Trichopyton mentagrophytes*'in üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>(42,43)</sup>. Drutz ve ark.<sup>(44)</sup> 17- $\beta$  östradiolün, *Coccidioides immitis* üremesini büyük ölçüde uyardığını, sferül olgunlaşma hızını ve endospor salınımını arttırdığını göstermişlerdir. Zhang ve ark.<sup>(45)</sup> 17- $\beta$  östradiolün 3 farklı *C. albicans* suşunun üremesini arttırdığını göstermişlerdir.

Bir diğer konak faktörü olan insülinin etkisini araştıran Plotkin ve Viselli<sup>(2)</sup>, 400  $\mu$ U'lık insülin varlığında *E. faecalis* ve *P. aeruginosa*'nın kontrole göre üremesinin sonuçlarımıza benzer şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Woods ve ark.<sup>(46)</sup>, tarafından ise *Burkholderia pseudomallei*'nin insülin reseptörüne yüksek afinitesi olduğu belirtilmiş ve bunun da diyabet hastalarında serumdaki insülin miktarına bağlı olarak melio-

idoz gelişimini tetiklediği öne sürülmüştür. Gümüş ve ark.<sup>(47)</sup> tarafından bir üropatojen *E. coli* suşunun üremesinin insülin varlığında değişmediği ancak 200  $\mu$ U/mL insülin varlığında *sfa/foc*, *cnf1* ve *usp* gibi virülans genlerinin ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak, mikrobiyal endokrinoloji alanında yapılan çalışmaların artması sayesinde, enfeksiyon hastalıklarının patogenezi ve patogeneze farklı âlemler arasında kurulan bu konuşma dilinin rolü daha iyi anlaşılacak ve tedavi yöntemleri arasına bu iletişimin kesilmesini temel alan yeni yöntemler katılabilecektir. Özellikle bakterileri öldürmek (bakterisidal) yada üremelerini durdurmak (bakteriyostatik) gibi iki temel etki şekliyle çalışan antibiyotikler yerine, bakterilerde yeni hedef moleküllerin ve virulansı doğrudan engelleyen yeni ilaçların bulunması mümkün olacaktır. Bu olasılıklar, bakteri ve memeliler arasındaki ilişki ve bu ilişkiyi kuran her türlü sinyal yolağı ve moleküller üzerine yapılan çalışmaları değerli kılmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Lyte M, Freestone PP, eds. Microbial Endocrinology: Inter kingdom Signaling in Infectious Disease and Health. New York: Springer; 2010.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5576-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5576-0_1)
2. Plotkin BJ, Viselli SM. Effect of insulin on microbial growth. Curr Microbiol. 2000;41(1):60-4.
3. Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melanogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. Infect Immun. 1982;35(1):256-63.
4. Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. Microbiology. 2007;153(Pt12):3923-38.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0>
5. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: the language of hormones. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(15): 8951-6.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1537100100>
6. Hughes DT, Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nat Rev Microbiol. 2008;6(2):111-20.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1836>
7. Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. FEMS Microbiol Lett. 1999;172(1):53-60.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13449.x>
8. Lyte M, Frank CD, Green BT. Production of an autoinducer of growth by norepinephrine cultured *Escherichia coli* O157:H7. FEMS Microbiol Lett. 1996;139(2-3):155-9.
9. Pacheco AR, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: chemical



- language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(2):192-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.006>
10. Freestone P. Communication between bacteria and their hosts. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:361073.  
<https://doi.org/10.1155/2013/361073>.
  11. LeRoith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak MA. Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1981;256(13):6533-6.
  12. Pan JX, Mikkelsen RB, Wallach DF, Asher CR. Synthesis of a somatostatin like peptide by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987;25(1):107-11.  
[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90023-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90023-5)
  13. Schär G, Stover EP, Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Progesterone binding and inhibition of growth in *Trichophyton mentagrophytes*. *Infect Immun*. 1986; 52(3):763-7.
  14. Rowland SS, Falkler WA, Bashirelahi N. Identification of an estrogen binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;42(7):721-7.
  15. Burshell A, Stathis PA, Do Y, Miller SC, Feldman D. Characterization of an estrogen binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1984; 259(6):3450-6.
  16. Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(24):7659-63.
  17. White S, Larsen B. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cell Mol Life Sci*. 1997;53(9):744-9.
  18. Harvey WD. Identification of 17 $\beta$ -estradiol as the estrogenic substance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(15):4722-6.
  19. Loose DS, Feldman DA. Characterization of a unique corticosteroid binding protein in *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 1982;257(9):4925-30.
  20. Lyte M. The role of microbial endocrinology in infectious disease. *J Endocrinol*. 1993;137(3):343-45.
  21. Lyte M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2004;12(1):14-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.11.004>
  22. Freestone PPE, Lyte M. Microbial endocrinology: experimental design issues in the study of interkingdom signalling in infectious disease. *Adv Appl Microbiol*. 2008;64:75-105.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00402-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00402-4).
  23. Lyte M, Freestone P. Microbial endocrinology comes of age. *Microbe*. 2009;4:169-75.  
<https://doi.org/10.1128/microbe.4.169.1>
  24. Freestone P, Lyte M. Stress and microbial endocrinology: prospects for ruminant nutrition. *Animal*. 2010;4(7):1248-7.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731110000674>
  25. Kurakado S, Kurogane R, Sugita T. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits estrogen binding protein-mediated hypha formation in *Candida albicans*. *Microb Pathog*. 2017;109:151-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.038>.
  26. Plotkin BJ, Roose R J, Erikson Q, Viselli SM. Effect of androgens and glucocorticoids on microbial growth and antimicrobial susceptibility. *Curr Microbiol*. 2003;47(6):514-20.
  27. Hosoda K, Shimomura H, Hayashi S, Yokota K, Hirai Y. Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;318(1):68-75.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02239.x>
  28. McCartney CR, Marshall JC. Neuroendocrinology of reproduction. In: Strauss JF, Barbieri RL, eds. *Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. 7th ed. Elsevier Health Sciences, 2014:3-26.
  29. <http://stedmansonline.com/webFiles/Dict-Stedmans28/APP17.pdf> (Erişim tarihi: 04.01.18)
  30. Aun F, Mequid MM, Soeldner JS, Stolf NA. Urinary insulin levels in health and disease - a concise review. *Postgrad Med J*. 1975;51(599):622-6.
  31. Phillips PE, Edge JA, Harris DA, et al. Urinary excretion and clearance of insulin in diabetic and normal children and adolescents. *Diabet Med* 1993;10(8):707-14.
  32. Sandrini S, Alghofaili F, Freestone P, Yesilkaya H. Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. *BMC Microbiol*. 2014;14:180-92.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-18>
  33. Fteita D, Könönen E, Söderling E, Gürsoy UK. Effect of estradiol on planktonic growth, coaggregation, and biofilm formation of the *Prevotella intermedia* group bacteria. *Anaerobe*. 2014;27:7-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.02.003>
  34. Lyte M, Freestone PP, Neal CP, et al. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet*. 2003; 361(9352):130-5.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12231-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12231-3)
  35. Apan OC, Apan TZ, Apan A. In vitro antimicrobial activity of commonly used vasoactive drugs. *J Clin Anesth*. 2016;34:407-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2016.05.008>
  36. Lyte M, Ernst S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci*. 1992;50(3):203-12.  
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90273-R](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90273-R)
  37. Freestone PP, Hirst RA, Sandrini SM, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-catecholamine inotrope interactions: a contributory factor in the development of ventilator-associated pneumonia? *Chest*. 2012;142(5): 1200-10.  
<https://doi.org/10.1378/chest.11-2614>.
  38. Anderson MT, Armstrong SK. The Bordetella bfe system: growth and transcriptional response to siderophores, catechols, and neuroendocrine catecholamines. *J Bacteriol*. 2006;188(16):5731-40.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00495-06>
  39. Anderson MT, Armstrong SK. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 2008;190(11):3940-7. <https://doi.org/10.1128/JB.00086-08>.
  40. Yokoyama M, Hinode D, Masuda K, Yoshioka M, Grenier D. Effect of female sex hormones on *Campylobacter rectus* and human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(4):239-43.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00222.x>
  41. Edwards JL. *Neisseria gonorrhoeae* survival during primary human cervical epithelial cell infection requires nitric oxide and is augmented by progesterone. *Infect Immun*. 2010;78(3):1202-13.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.01085-09>
  42. Reiss F. The effect of hormones on the growth of *Trichophyton purpureum* and *Trichophyton gypsum*. *J Invest Dermatol*. 1947;8(5):245-50.  
<https://doi.org/10.1038/jid.1947.35>
  43. El-Sherif S, Refai M. Studies on the fungistatic action of hormones on dermatophytes. *E Rodenwaldt-Archiv*. 1976;3(4):101-8.
  44. Drutz D, Huppert M, Sun S, McGuire W. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun*. 1981;32(2):897-907.
  45. Zhang X, Essmann M, Burt ET, Larsen B. Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. *J Infect Dis*. 2000;181(4): 1441-6.  
<https://doi.org/10.1086/315406>
  46. Woods DE, Jones AL, Hill PJ. Interaction of insulin with *Pseudomonas pseudomallei*. *Infect Immun*. 1993;61(10):4045-50.
  47. Gumus D, Yoruk E, Kalayci-Yuksef F, Uz G, Topal-Sarikaya A, Ang-Kucuker M. The effects of insulin and glucose on different characteristics of a UPEC: Alterations in growth rate and expression levels of some virulence genes. *Clin Lab*. 2017;63(10):1589-97.  
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.170313>

# Giardia intestinalis Genotiplerinin, Real-Time PCR Yöntemi ile Dışkı Örneklerinden Belirlenmesi

Mehmet DEMİRCİ<sup>\*✉</sup>, Akın YİĞİT<sup>\*\*✉</sup>, Cemil DEMİR<sup>\*\*\*✉</sup>, Düriye Pelin ACEL<sup>\*\*\*\*✉</sup>

<sup>\*</sup>Beykent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>\*\*</sup>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa

<sup>\*\*\*</sup>Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mardin

<sup>\*\*\*\*</sup>Gaziantep Üniversitesi, Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Gaziantep

## ÖZ

**Amaç:** Giardia intestinalis flagellalı, Giardiyaz'a neden olan bir protozondur ve dünya çapında önemli bir sorundur. Moleküler yöntemlerle sekiz farklı genotipi saptanan G. intestinalis'de, A ve B genotipinin, insan ve memelilerde hastalıklarla ilişkili olduğu ve farklı genotiplerin, farklı klinik tablolar meydana getirebildiği bildirilmektedir. Biz de bu bilgiler ışığında, giardiyaz tanısı almış ve G. intestinalis pozitif saptanan dışkı örneklerinde bulunan G. intestinalis genotiplerinin dağılımını real-time PCR yöntemi ile belirlemeyi ve moleküler epidemiyolojik bir veri sunmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Ocak 2016-Ocak 2018 tarihleri arasında, hem nativ hem de lugol ile mikroskopik olarak incelenen dışkı örnekleri içinde G. intestinalis kist ve/veya trofozoit'i pozitif bulunan 50 G. intestinalis pozitif hastanın dışkı numuneleri çalışmaya dâhil edildi. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra genotip A ve genotip B için spesifik primerler kullanılarak real-time PCR ile analiz edildi.

**Bulgular:** Çalışmamıza dâhil edilen 50 giardiyaz tanılı hastanın dışkı örneklerinde, 28'inde (%56) A genotipi saptanırken, 17'sinde (%34) B genotipi, 5'inde (%10) ise hem A, hem de B genotipi bulundu. Cinsiyete göre saptanan genotipler incelendiğinde, erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 25 (%50) ve 25 (%50) olarak bulundu.

**Sonuç:** Sonuç olarak, çalışmamız ile ülkemizde giardiyaza neden olan ama ayrımı yalnızca moleküler yöntemlerle ortaya konabilen G. intestinalis genotipleri incelenerek, G. intestinalis'in A genotipinin, B genotipine oranla biraz daha fazla olduğu belirlendi. Ülkemizde G. intestinalis'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır. Bu çalışmanın buna katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Giardia intestinalis, genotip, real-time PCR

## ABSTRACT

**Determination of Giardia intestinalis Genotypes in Stool Specimens by Real-Time PCR Method**

**Objective:** As a causative agent giardiasis, Giardia intestinalis is a flagellated protozoa, and it is a major problem worldwide. Eight different genotypes have been identified in G. intestinalis by molecular method. It has been reported that the genotypes A and B are related to diseases in human and mammals and different genotypes cause different clinical pictures. In this study, we aimed to determine the distribution of G. intestinalis genotypes in stool specimens of G. intestinalis positive patients by real-time PCR and to present a molecular epidemiological data.

**Material and Methods:** Between January 2016 and January 2018, stool samples from fifty G. intestinalis cyst and / or trophozoite positive patients were included in the study. Native and lugol-treated stool specimens were microscopically examined. DNA isolation from stool specimens was performed and then analyzed by real-time PCR using specific primers for genotypes A and B.

**Results:** In stool samples of fifty patients with diagnosis of giardiasis included in our study, genotype A (n=28: 56%), genotype B (n=17: 34%) and both genotype A and genotype B (n=5: 10%) were detected. These genotypes were found in 25 (50%) male, and 25 (50%) female patients.

**Conclusion:** In conclusion, we investigated G. intestinalis genotypes which cause giardiasis in our country but these genotypes can only be distinguished by molecular methods. We found that G. intestinalis genotype A is slightly more frequent than genotype B. In our country, the data on the molecular epidemiology of G. intestinalis genotypes are very limited. We believe this work will contribute to this.

**Keywords:** Giardia intestinalis, assemblages, real-time PCR

Alındığı tarih: 06.06.2018

Kabul tarihi: 24.06.2018

**Yazarların ORCID bilgileri:**

Mehmet Demirci 0000-0001-9670-2426 Akın Yiğit 0000-0001-9758-1697

Cemil Demir 0000-0002-6365-0196 Düriye Pelin Acel 0000-0001-5792-2792

## GİRİŞ

*Giardia intestinalis* (*G. intestinalis* ile eşanlamlı *Gierdia duodenalis* ve *Gierdia lamblia*) flagellalı, giardiyaza neden olan bir protozondur<sup>(1)</sup>. Viral ve bakteriyel olmayan ishallerin başlıca nedeni olan giardiyaz, dünya çapında önemli bir sorundur ve her yıl dünya çapında 280 milyon yeni olgu görülmektedir<sup>(2)</sup>. Giardiyaz, 200 milyon kişinin asemptomatik taşıyıcı olarak düşünüldüğü ve her yıl yaklaşık 500.000 yeni olgunun görüldüğü Asya, Afrika ve Latin Amerika gibi bölgelerde 2004 yılından beri Dünya Sağlık Örgütü tarafından ihmal edilen hastalık girişimine dâhil edilmiştir<sup>(2)</sup>. Giardiyaza neden olan *G. intestinalis* türü üyelerinin morfolojik olarak hemen hemen özdeş olduğu ancak protein veya DNA polimorfizmlerine dayanan moleküler yöntemlerle incelendiğinde en az sekiz farklı genotipinin (A-H) olduğu bilinmektedir<sup>(3)</sup>. Bu sekiz genotip'ten A ve B genotipinin, insan ve memelilerde hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilirken, köpek cinslerinde C ve D, geviş getiren hayvanlarda E, kedilerde F, kemirgenlerde G ve deniz memelilerinde H genotipinin görüldüğü bilinmektedir. C-H genotiplerinin sıklıkla konak spesifik olduğu düşünülmektedir. C-H genotiplerinin insanlarda zoonotik etkileri net değildir<sup>(4)</sup>. Fakat A genotipi ile gelişen ishal olgularının, B genotipine göre daha şiddetli olduğu bildirilmektedir<sup>(5)</sup>. Klasik yöntemlerle bu tiplerin belirlenmesi olası değildir. Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler tekniklerin hassasiyeti, mikroskop gibi klasik yöntemlere göre daha iyidir. Bu da özellikle dışkı örnekleri gibi düşük sayıdaki parazitlerin bulunduğu numunelerde bu parazitin saptanmasında ve genotipinin belirlenmesinde büyük yarar sağlar<sup>(6)</sup>. Gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) özellikle farklı tiplerin numune içerisinde aynı anda bulunması durumunda, PCR yöntemine göre daha güvenilir ve daha doğru sonuçlar sunabilen bir moleküler yöntemdir<sup>(7)</sup>. A ve B genotipinde bildirildiği gibi farklı genotiplerle gelişen, giar-

dia enfeksiyonlarında, farklı klinik tabloların gözlenmesi, *G. intestinalis* genotip gruplarının farklı patojenik özelliklere sahip olabileceğini ve bunların ayrımının yapılmasının kliniğe tedavi açısından yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ülkemizde *G. intestinalis*'in prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın<sup>(8)</sup>, *G. intestinalis*'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır. Biz de bu çalışma ile giardiyaz tanısı almış ve *G. intestinalis* pozitif saptanan dışkı örneklerinde bulunan *G. intestinalis* genotiplerinin dağılımını real-time PCR yöntemi ile belirlemeyi ve moleküler epidemiyolojik bir veri sunmayı amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2016-Ocak 2018 tarihleri arasında hastaneye başvuran giardiyaz şüpheli semptomatik hastaların dışkı örnekleri dâhil edildi. Hem nativ hem de lugol ile mikroskopik olarak incelenen dışkı örnekleri içinde *G. intestinalis* kist ve/veya trofozoit'i pozitif bulunan 50 *G. intestinalis* pozitif hastanın dışkı numuneleri çalışmaya dahil edilmek üzere saklandı. Tüm dışkı örnekleri DNA izolasyonuna alınmaya kadar -20°C'da saklandı. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu, QIAamp DNA stoolmini test kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi<sup>(9)</sup>. DNA örnekleri real-time PCR işlemlerine kadar -20°C'da saklandı.

DNA'lardan *G. intestinalis* genotiplerinin belirlenmesi için genotiplere spesifik primerler kullanıldı. A genotipi için translasyon başlatma faktörü geni (Tif-Gen ID: GL50803 39587), B genotipi için cathepsin L prekürsör genine (Cath-Gen ID: GL50581 3714) özgün primerler seçildi<sup>(7)</sup> ve primerler IDT (Integrated DNA Technologies inc, Coraville, IA, Amerika) firmasından sağlandı.

Real-time PCR işlemlerinde LightCycler 480

SybrGreen I master kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kiti üretici direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Her bir reaksiyonda, 0.3 nmol primer kullanıldı ve toplam 20 µl hacimde çalışma gerçekleştirildi. Real-time PCR reaksiyonları için LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) sistemi üretici direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Real-time PCR reaksiyonu 95°C'da 5 dk. denatürasyonu takiben, 45 döngülük çoğaltma programında 95°C'da 10 sn, 55°C'da 20 sn ve 72°C'da 15 sn olacak şekilde gerçekleştirildi. 72°C'da veri toplandı. Reaksiyonlarda özgün PCR ürünleri olduğunu kontrol edebilmek amacıyla çoğaltma programını takiben erime eğrisi programı uygulandı, bunun için 95°C'da 5 sn, 60°C'da 1 dak. ve 97°C'da sürekli floresan toplama şeklinde program oluşturuldu.

## BULGULAR

Çalışmamıza dâhil edilen 50 giardiyaz tanılı

hastanın dışkı örneklerinin retrospektif olarak demografik verileri incelendiğinde, bunların 1 ile 54 yaş arasında olduğu yaş ortalamasının 14.42 olduğu görüldü. Bu dışkı örneklerinden yapılan tif ve cath genleri real-time PCR çalışmaları sonrasında 28'inde (%56) A genotipi saptanırken, 17'sinde (%34) B genotipi ve 5'inde (%10) hem A hem de B genotipi bulundu. Cinsiyete göre saptanan genotipler incelendiğinde, erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 25 (%50) ve 25 (%50) olarak bulundu (Tablo 2).

Yaş gruplarına ait veriler incelendiğinde, 0-9 ve 10-19 yaş grubunun çalışmadaki dışkı örneklerinin %78'ini oluşturduğu ve A genotipinin 18 (%36) ve B genotipinin 16 (%32) oranında olduğu saptanırken, ilerleyen yaşlarda hemen hemen tüm örneklerde yalnızca A genotipinin saptandığı gözlemlendi. Cinsiyet açısından bakıldığında, genotiplerin erkek ve kadınlarda eşit dağılım gösterdiği görülmektedir (Tablo 2).

**Tablo 1. Real-time PCR'da kullanılan primer dizileri ve özellikleri<sup>(7)</sup>.**

| Primer Adı    | Dizi                          | Gen ID        | Amplikon Büyüklüğü (bp) | Erime Sıcaklığı |
|---------------|-------------------------------|---------------|-------------------------|-----------------|
| TIF Ass. A F  | 5' AGAAGTGTCTGGACTGGGTCT 3'   | GL50803_39587 | 168                     | 87.8            |
| TIF Ass. A R  | 5' CGTGGAATTGTCAATCGTTAAAC 3' |               |                         |                 |
| CATH Ass. B F | 5' GCGATTTTCCGCGGAAGGTTGT 3'  | GL50581_3714  | 99                      | 81.2            |
| CATH Ass. B R | 5' AGAGGCATCATAAACATAAACC 3'  |               |                         |                 |

**Tablo 2. Yaş gruplarına ve cinsiyete göre hastalarda saptanan A, B ve AB genotiplerinin dağılımı n (%).**

|                                  | <i>Giardia intestinalis</i> genotipi |         |        |          |
|----------------------------------|--------------------------------------|---------|--------|----------|
|                                  | A                                    | B       | AB     | Toplam   |
| <b>Yaş grubu (ortalama ± SD)</b> |                                      |         |        |          |
| 1-9 (5.24±2.83)                  | 11 (22)                              | 10 (20) | 4 (8)  | 25 (50)  |
| 10-19 (14±3.05)                  | 7 (14)                               | 6 (12)  | 1 (2)  | 14 (28)  |
| 20-29 (24.6±2.87)                | 2 (4)                                | 1 (2)   | 0 (0)  | 3 (6)    |
| 30-39 (34.8±2.79)                | 5 (10)                               | 0 (0)   | 0 (0)  | 5 (10)   |
| >40 (48.7±4.11)                  | 3 (6)                                | 0 (0)   | 0 (0)  | 3 (6)    |
| Toplam (14.42±13.01)             | 28 (56)                              | 17 (34) | 5 (10) | 50 (100) |
| <b>Cinsiyet</b>                  |                                      |         |        |          |
| Erkek                            | 14 (28)                              | 9 (18)  | 2 (4)  | 25 (50)  |
| Kadın                            | 14 (28)                              | 8 (16)  | 3 (6)  | 25 (50)  |

## TARTIŞMA

Giardiyaz, dünya çapında insanlarda en yaygın bağırsak parazit hastalıklarından birisi olarak kabul edilir ve bu enfeksiyon özellikle çocuklar üzerinde güçlü bir klinik etkiye sahiptir<sup>(10)</sup>. Ülkemizde *G. intestinalis*'in prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın<sup>(8,11)</sup>, *G. intestinalis*'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır. Morfolojik açıdan benzer olmalarına rağmen, *G. intestinalis*'in moleküler yöntemlerle sekiz farklı genotipi tanımlanmıştır ve özellikle A ve B genotipinin, insan ve memelilerde hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmektedir<sup>(12)</sup>. Patojenitelerinin farklılığı kaynaklı, farklı klinik tablolar oluşturabilen bu genotiplerinin hızlı ve doğru tanısının yapılması bu nedenle önemlidir. Yurtdışında yapılan çalışmalar incelendiğinde, Jerez Puebla ve ark.'nın<sup>(10)</sup>, 2017 yılında Küba'da çocuklarda yaptıkları bir çalışmada, semptomatik hastaların 24'ünde B, 10'unda A ve yedisinde AB genotiplerini saptadıkları görülmektedir. Yine aynı çalışmada, semptomatik ve asemptomatik çocuklarda cinsiyetlere göre genotiplerin durumu incelendiğinde, erkek çocuklarında sırasıyla 13, 17 ve 7 olarak, kız çocuklarında ise 4, 14 ve 7 olarak A, B ve AB genotipleri bildirilmiştir. Mbae ve ark.'nın<sup>(13)</sup> 2016 yılında Kenya'da çocuklarda yaptıkları bir çalışmada, 72 *G. intestinalis* pozitif örneğin iki tanesinde A, 64'ünde B ve 7'sinde AB genotipleri bildirilmektedir. Yine aynı çalışmada, semptomatik çocuklarda cinsiyetlere göre genotiplerin durumu incelendiğinde, erkek çocuklarında sırasıyla 1, 39 ve 4 olarak, kız çocuklarında ise 0, 25 ve 3 olarak A, B ve AB genotiplerini bildirilmişlerdir<sup>(13)</sup>. Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada, semptomatik olan ve olmayan tüm çocuklardan elde edilen 40 *G. intestinalis* kökeninin 23 tanesinin A, 15 tanesinin ise B genotipinde olduğu bildirilirken, semptomatik olan çocukların yalnızca 7'sinde A genotipinin olduğu belirtilirken, B genotipi saptanan 15 çocuğun tamamının semptomatik oldu-

ğu saptanmıştır<sup>(14)</sup>. Minetti ve ark.'nın<sup>(15)</sup> İngiltere'de 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, kökenlerin %64'ünü genotip B, %36'sını da genotip A olarak bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Tamer ve ark.<sup>(16)</sup>, 2015 yılında çocuklarda yaptıkları çalışmalarında, sırasıyla A, B ve AB genotipini semptomatik çocuklarda 8, 2 ve 3 olarak asemptomatik çocuklarda ise 3, 5 ve 1 olarak bildirmişlerdir. Çiçek ve Şakru<sup>(17)</sup>, 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında, 17 örneğin dokuzunu genotip A, sekizini genotip B olarak bildirmişlerdir. Ertuğ ve ark.<sup>(18)</sup>, 2016 yılında yaptıkları çalışmada, 10 *G. intestinalis* kökeninin sekizinin A ve ikisinin B genotipinde olduğunu görülmektedir. Vurupalmaz ve Öter'in<sup>(5)</sup> 2016 yılında yaptıkları çalışmalarında, 69 *G. intestinalis* kökeninin 67'sinin genotip A saptandığı, yalnızca 2'sinin genotip B olduğu belirtilmiştir. Balcıoğlu ve ark.'nın<sup>(19)</sup> 2012 yılında, farklı yaş gruplarında yaptıkları çalışmalarında, sırasıyla A ve B genotipini 38 ve 16 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Ulusal ve uluslararası yapılan bu çalışmaların sonuçları genel olarak incelendiğinde farklı ülkelerde, farklı genotiplerle karşılaşıldığı bazı ülkelerde A, bazı ülkelerde de B genotipinin baskın olduğu ama ülkemizde dahi verilerin değişkenlik gösterebildiği görülmektedir. Sonuçlarımız ülkemizdeki sonuçlarla genel olarak A genotipi yoğunluğunun fazla oluşu açısından benzerlik gösterirken, yurtdışında tartışmaya aldığımız uluslararası çalışmalara göre B genotipinin az oluşu yönüyle fark içermektedir. Bunun nedeninin yukarıda da düşündüğümüz gibi özellikle *G. intestinalis* genotiplerinin ülkeden ülkeye farklılık gösterebilmesi kaynaklıdır. Çalışmamızda yer verilmemesine karşın farklı çalışmalarda, *G. intestinalis* genotiplerinin farklı klinik tablolar meydana getirebildiği görülmektedir<sup>(9,19)</sup>. Bu nedenle kliniğe veri sağlaması açısından morfolojik olarak mikroskop altında ayırt edilemeyen bu parazitin genotiplerinin çalışmamızda kullanılan real-time PCR gibi moleküler yöntemlerle hızlı belirlenmesi değerlidir.



Sonuç olarak, çalışmamız ile ülkemizde giardiya neden olan genotipler ortaya konulmakta, A ve B genotipinin çocuklarda semptomatik olgularda birbirine yakın oranlarda gözlemlendiği ama ilerleyen yaş gruplarında genotip A'nın daha yaygın olduğu görülmektedir. Ülkemizde *G. intestinalis*'in prevalansı ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın, *G. intestinalis*'in moleküler epidemiyolojisine yönelik veriler sınırlıdır ve bu çalışmanın epidemiyolojik olarak katkı sağlayacağı ve ülkeden ülkeye değişim gösterebilen genotip dağılımını anımsatmayı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Lloyd D, Harris JC, Maroulis S, et al. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. *Microbiology*. 2002;148(5):1349-54. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1349>
2. Vanni I, Cacciò SM, van Lith L, et al. Detection of *Giardia duodenalis* assemblages A and B in human feces by simple, assemblage-specific PCR assays. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1776. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001776>
3. Thompson RC, Monis P. Giardia-from genome to proteome. *Adv Parasitol*. 2012;78:57-95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394303-3.00003-7>
4. Helmy YA, Spierling NG, Schmidt S, et al. Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):213. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2802-z>
5. Vurupalmaz Y, Öter V. Giardiasis tanılı hastaların dışkı örneklerinde TPI gen lokusu hedeflenerek *G. intestinalis* genotiplerinin PCR-RFLP yöntemiyle araştırılması. *Kocatepe Tıp Derg*. 2016;17(4):109-17. <https://doi.org/10.18229/kocatepetip.289092>
6. Guy RA, Xiao C, Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3317-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3317-3320.2004>
7. Van Lith L, Šoba B, Vizcaino VV, et al. A real-time assemblage-specific PCR assay for the detection of *Giardia duodenalis* assemblages A, B and E in fecal samples. *Vet Parasitol*. 2015;30;211(1-2):28-34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.017>
8. Kirkoyun Uysal H, Akgül O, Purisa S, Oner YA. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 25 yıllık intestinal parazit prevalansı: Retrospektif bir çalışma. *Türkiye Parazitol Derg*. 2014;38(2):97-101. <https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3327>
9. Minetti C, Taweean W, Hogg R, et al. Occurrence and diversity of *Giardia duodenalis* assemblages in livestock in the UK. *Transbound Emerg Dis*. 2014;61(6):e60-7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12075>
10. Jerez Puebla LE, Núñez FA, Santos LP, et al. Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiol Control*. 2017;24;2(3):105-13. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2017.05.003>
11. Okyay P, Ertug S, Gultekin B, Onen O, Beser E. Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample-Turkey. *BMC Public Health*. 2004;4:64. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-4-64>
12. Plutzer J, Lassen B, Jokelainen P, et al. Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016. *Euro Surveill*. 2018;23(4):16-00825. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.16-00825>
13. Mbae C, Mulinge E, Guleid F, et al. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children in Kenya. *BMC Infect Dis*. 2016;16:135. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1436-z>
14. Al-Mohammed HI. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res*. 2011;108(6):1375-81. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2033-5>
15. Minetti C, Lamden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A, Wastling JM. Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasit Vectors*. 2015;8:444. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1059-z>
16. Tamer GS, Kasap M, Er DK. Genotyping and phylogenetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from Turkish children. *Med Sci Monit*. 2015;21:526-32. <https://doi.org/10.12659/MSM.892318>
17. Çiçek C, Şakru N. Trakya Bölgesi'ndeki *Giardia intestinalis* izolatlarının genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49(4):576-85. <https://doi.org/10.5578/mb.10107>
18. Ertuğ S, Ertabaklar H, Özlem Çalışkan S, Malatyalı E, Bozdoğan B. Aydın'da insanlardan izole edilen *Giardia intestinalis* suşlarının genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(1):152-8. <https://doi.org/10.5578/mb.10387>
19. Balcıoğlu C, Kurt O, Sevil N, et al. Genotyping of *Giardia lamblia* in a cohort of Turkish patients: A search for a relationship between symptoms and genotypes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012;18(Suppl A):A125-31. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5968>

# Giresun İlinde İzole Edilen Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecium* Klinik İzolatlarının Moleküler Özellikleri<sup>§</sup>

Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Şule KIRCA\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Selma KELEŞ ULUDAĞ\*\*\*, Gökçen DİNÇ\*\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Alper ÇİFTÇİ\*\*\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>

\*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Samsun

\*\*Giresun Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Giresun

\*\*\*Dr. Ayten Bozkaya Spastik Çocuklar Hastanesi, Bursa

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

\*\*\*\*\*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

## ÖZ

**Amaç:** Son yıllarda nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan *Enterococcus faecium* izolatlarının artan çoklu antimikrobiyal direnç gelişimi, özellikle virulans faktörleri gibi birçok özelliğinin daha ayrıntılı incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Çalışmada, vankomisine dirençli *E. faecium* (VREfm) izolatlarının virulans faktörlerinin, direnç genlerinin ve genotipik benzerliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Giresun Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan ve fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunan 37 adet *Enterococcus faecium* izolatı incelenmiştir. İzolatların tanımlaması ve in vitro antimikrobiyal duyarlılık testleri Vitek-2 otomatize sistemi (BioMérieux, ABD) ile yapılmıştır. Vankomisine ve teikoplanine direnç durumları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Vankomisin direnç genleri vanA, vanB ve virulans genleri esp, gelE, hyl, cyla ve asaI genleri PCR ile araştırılmıştır. Biyofilm üretimi fenotipik olarak Kongo Red Agar (CRA) yöntemi ile belirlenmiştir. Klonal ilişkinin belirlenmesi için RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** İzolatların tümü vankomisin ve teikoplaninin yanı sıra tetrasiiklin, norfloksasin, eritromisin, siprofloksasin, ampisiline dirençli, linezolid duyarlı bulunmuştur. Biyofilm üretimi tüm izolatlarda gözlenmiştir. İzolatların tümünün vanA geni ve vankomisin-teikoplanin direnci ile karakterize vanA fenotipine sahip olduğu görülmüştür. esp, gelE ve hyl genleri sırasıyla %62.2, %2.7 ve %27 oranlarında bulunmuştur, vanB, asaI ve cyla genleri ise hiçbir izolatta saptanmamıştır. RAPD-PCR ile genotipleme analizinde izolatların 3 ana RAPD grubu belirlenmiştir. esp geni taşıyan 23 izolatın tamamı dominant olan RAPD grubunda yer almaktadır. Genotipik olarak izolatların yakınlık derecesi değerlendirildiğinde yakın gruplar arasında homojenite gözlenmiştir.

**Sonuç:** VREfm'nin spesifik klonları ve virulans genleri arasında bir ilişki bulunamamıştır, ancak izolatlarda esp oranının yüksek oluşu bu genin bakterinin patojenitesi üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Vankomisine dirençli *E. faecium*, virulans genleri, moleküler

## ABSTRACT

**Molecular Characterization of Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Giresun City**

**Objective:** Recently, isolates of *Enterococcus faecium* have been the leading cause of nosocomial infections worldwide and have at the same time increased multimicrobial resistance which necessitated investigation of many characteristics especially virulence factors in detail for infection control and prevention. The aim of this study was to investigate the virulence factors, resistance genes and genotypic similarities in vancomycin resistant *E. faecium* (VREfm) isolates.

**Material and Methods:** The study included 37 *Enterococcus faecium* isolates obtained from various clinical specimens in microbiology laboratory of Giresun State Hospital. The identification and in vitro antimicrobial susceptibility tests of the isolates were performed using Vitek 2 automated system (BioMérieux, US). The susceptibility to vancomycin and teicoplanin were investigated using broth microdilution method. The presence of vancomycin resistance genes vanA, vanB and virulence genes esp, gelE, hyl, cyla and asaI were determined by PCR. Biofilm formation was also tested phenotypically by Congo Red Agar method. RAPD-PCR was performed to determine the clonal relationship among the isolates.

**Results:** All of the isolates were resistant to vancomycin, teicoplanin, tetracycline, norfloxacin, erythromycin, ciprofloxacin, ampicillin and susceptible to linezolid. The production of biofilm was observed in all isolates. All of the isolates had the vanA gene and the vanA phenotype characterised by resistance to vancomycin and teicoplanin. esp, gelE and hyl genes were detected in 62.2%, 2.2% and 27% of all the isolates, respectively. vanB, asaI and cyla genes were not detected in any of the isolates. Genotyping analysis of the isolates by RAPD-PCR identified three main RAPD groups. All of 23 isolates that carried the esp gene also belonged to the dominant RAPD group. When genotypical relationships of all the isolates was evaluated, homogeneity was observed between nearly similar groups.

**Conclusions:** No relationship was found between specific clones and virulence genes of VREfm; yet high positivity of the isolates for esp gene suggests the impact of this gene on bacterial pathogenicity.

**Keywords:** Vancomycin-resistant *E. faecium*, virulence genes, molecular epidemiology

**Alındığı tarih:** 06.06.2018

**Kabul tarihi:** 02.07.2018

<sup>§</sup> Bu çalışma, 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi'nde (4-7 Haziran 2014, Ankara) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

## Yazarların ORCID bilgileri:

Mehtap Ünlü Söğüt 0000-0001-9461-6428 Şule Kurca 0000-0003-4504-6304

Gökçen Dinç 0000-0002-9184-5003 Alper Çiftçi 0000-0001-8370-8677

## GİRİŞ

Enterokoklar insan ve hayvanların ağız florası, intestinal flora ve dişi genital sisteminin doğal üyeleri olmakla birlikte, fırsatçı patojen konumundadırlar<sup>(1)</sup>. Uç sıcaklıklarda (5-65°C), geniş pH aralığında (4.5-10.0) ve yüksek NaCl konsantrasyonlarında üreyebilmeleri yayılmalarını kolaylaştırır<sup>(2)</sup>. En sık görülen enterokok türleri *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olup, başlıca üriner sistem enfeksiyonlarına, intra-abdominal, intra-pelvik apselere ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olurlar<sup>(1)</sup>. Üriner sistem enfeksiyonlarında ikinci, nozokomiyal bakteriyemilerde üçüncü sırada etken olarak karşımıza çıkarlar. En sık izole edilen tür olan *E. faecalis* artmış virulansa sahipken son yıllarda prevalansı artmakta olan *E. faecium* çoklu ilaç direnci gösterir<sup>(3)</sup>.

Enterokoklar, virulans özelliklerini ya da antibiyotik direnç genlerini kodlayan ekstrakromozomal elementleri kazanıp aktararak antimikrobiyal direncin hızlı yayılımında ve persistansında önemli rol oynarlar<sup>(4,5)</sup>. Çeşitli antimikrobiyal ajanlara ve kullanılan antibiyotiklere kazanılan direncin tedavi seçeneklerini sınırlamasıyla yüksek düzey morbidite ve mortalite görülür<sup>(4,6)</sup>. Vankomisine dirençli enterokok (VRE) insidansındaki artışın vankomisinin yaygın kullanımıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Enterokoklar da dokuz vankomisin direnç fenotipi (*VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanM*, *VanN*) bulunmaktadır; *VanA* en baskın fenotiptir, yüksek düzey vankomisin ile teikoplanin direnci sergiler ve başlıca vankomisine dirençli *E. faecium* (VRE<sub>fm</sub>) ile ilişkilidir<sup>(6)</sup>.

Enterokoklarda bazı virulans faktörleri; agregasyon faktörü, jelatinaz, sitolizin (sitotoksik), enterokok yüzey proteini (*esp*) ve hyaluronidazdır (*hyl*)<sup>(7)</sup>. Virulans faktörleri bakterinin konak dokularına adezyon, kolonizasyon ve invazyonunu sağlayarak patojenitesine katkıda bulunur<sup>(8)</sup>.

VRE<sub>fm</sub> suşları çoğunlukla *esp* veya *hyl* taşır<sup>(6)</sup>. Agregasyon faktörü, plazmid üzerinde taşınan asal geni tarafından kodlanan bir glikoproteindir. Nötrofil, renal tubuler hücreler ve kalp endokard hücreleri gibi çeşitli hücrelere bakteriyel aderansı artırır<sup>(7,9)</sup>. Ayrıca konjugasyon sırasında bakteriyel agregasyona aracılık ederek plazmid alışverişini kolaylaştırır, bakterilerin yüzeylerde tutunarak kümeleşmesini sağlayarak biyofilm oluşumuna yardımcı olur<sup>(3)</sup>. Jelatinaz, kromozomal *gelE* tarafından kodlanır, ekstraselüler çinko-endopeptidaz olup, jelatini, kollajeni ve küçük peptidleri parçalayarak<sup>(7)</sup> bakterinin konak dokularına yayılmasını kolaylaştırır<sup>(10)</sup>, biyofilm oluşumu ile de ilişkilidir<sup>(2)</sup>. Sitolizin beta-hemolitik olup, hem prokaryotlar hem de ökaryotlara etkilidir, diğer Gram pozitif bakteriler üzerine bakterisidal etki gösterir<sup>(2,9)</sup>. Sitolizin üretiminin enterok enfeksiyonunu şiddetlendirdiği, hayvan modellerinde endokardit ve endoftalmiyi artırdığı belirlenmiştir. Sitolizin genleri plazmid üzerinde taşınabildiği gibi bakteri kromozomuna entegre olarak da bulunabilir<sup>(7)</sup>. Enterokok yüzey proteini kromozomal *esp* tarafından kodlanır; epitel hücrelerine adezyon, üriner sistemde artmış virulans, kolonizasyon ve persistansla ilişkili<sup>(6,7)</sup> olup, aynı zamanda biyofilm oluşumuna katkıda bulunur<sup>(6)</sup>. Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların antibiyotiklere ve fagositoza yüksek düzeyde direnç göstermelerini sağladığından biyofilm üretiminin incelenmesi önemlidir<sup>(11)</sup>. Hyaluronidaz kromozomal *hyl* geni tarafından kodlanır<sup>(7)</sup> ve doku hasarına yol açar. Bağ dokusundaki mukopolisakkariti depolimerize ederek bakterinin ve toksinlerinin dokularda yayılmasını kolaylaştırır<sup>(2)</sup>.

Enterokok izolatlarının ayırt edilmesinde epidemiyolojik çalışmalarda son yıllarda çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan bazıları; farklı antibiyotik direnç profillerine dayalı antibiyotiplendirme, genotiplemede rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), değişken alanlı jel elektroforezi

(PFGE), ribotipleme, amplifiye fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve multilokus dizi analizi (MLST)'dir<sup>(12)</sup>. Bu yöntemler arasında RAPD kolay uygulanabilir, hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemdir<sup>(13)</sup>.

Çalışmanın amacı çeşitli klinik örneklerden elde edilen vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarının virulansında rol oynayan faktörlerin, direnç profillerinin ve genotipik benzerliklerinin araştırılmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Bakteri İzolatları:** Çalışma kapsamında, Giresun Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan ve fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunan 37 adet *E. faecium* izolatı kullanılmıştır. *E. faecium* izolatları, perirektal sürüntü (n=31), idrar (n=4), kan (n=1) ve aspirasyon sıvısı (n=1) izolatları olup Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi (n=10), Dâhiliye Yoğun Bakım Ünitesi (n=6), Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi (n=6), Gastroenteroloji Servisi (n=2), Anestezi ve Reanimasyon (n=4), Nöroloji Servisi (n=5) ve Koroner Yoğun Bakım (n=4) ünitelerinden izole edilmiştir. İzolatlar Vitek-2 (BioMérieux, ABD) otomatize sistemi ile tür düzeyinde tanımlanarak PCR yöntemiyle de genotipik olarak doğrulanmıştır<sup>(14)</sup>. Çeşitli antibiyotiklere (linezolid, gentamisin, levofloksasin, teikoplanin, tetrasiklin, streptomisin, norfloksasin, nitrofurantoin, eritromisin, siprofloksasin, ampisilin ve penisilin G) in vitro duyarlılık testleri Vitek-2 otomatize sistemiyle yapılmıştır. Ayrıca vankomisin ve teikoplanin duyarlılığının belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon testi uygulanmış, sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre değerlendirilmiştir.

**Biyofilm Oluşumu:** Biyofilm üretiminin belirlenmesi için Kongo Red Agar (CRA) kullanılmıştır. CRA üzerindeki siyah koloniler biyofilm

üretiminde pozitif, pembe ve renksiz koloniler ise biyofilm üretimi için negatif olarak değerlendirilmiştir<sup>(15)</sup>.

**Vankomisin Direnç ve Virulans Genlerinin Saptanması:** Daha önceden tanımlanmış olan PCR protokolü kullanılarak vankomisin direncinden sorumlu genler (*vanA*, *vanB*) araştırılmıştır<sup>(16)</sup>. *esp*, *gelE*, *hyl*, *cylA* ve *asaI* virulans genlerini belirlemek için Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> tarafından tanımlanan primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

**RAPD-PCR Amplifikasyonu:** RAPD-PCR analizi M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') kullanılarak gerçekleştirilmiştir<sup>(17)</sup>. RAPD profilleri arasındaki benzerlik Dice benzerlik katsayısı, CHEF-DR® III, Quantity One® Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) programı ve "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA)" algoritması kullanılarak çizilen dendrogram üzerinde, Dice %70 benzerlik eşik değeri ile oluşturulan gruplarla tanımlanmıştır.

## BULGULAR

Çalışma kapsamında incelenen *E. faecium* izolatlarının tümünün biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *E. faecium* izolatlarının antibiyotik direnç (R)/duyarlılık (S) oranları Tablo 1'de gösterilmiştir. İzolatların tümü vankomisin ve teikoplaninin yanı sıra tetrasiklin, norfloksasin, eritromisin, siprofloksasin, ampisiline dirençli, linezolide duyarlı bulunmuştur. Vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri kullanılarak uygulanan sıvı mikrodilüsyon testi sonucunda, tüm izolatlar için vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir.

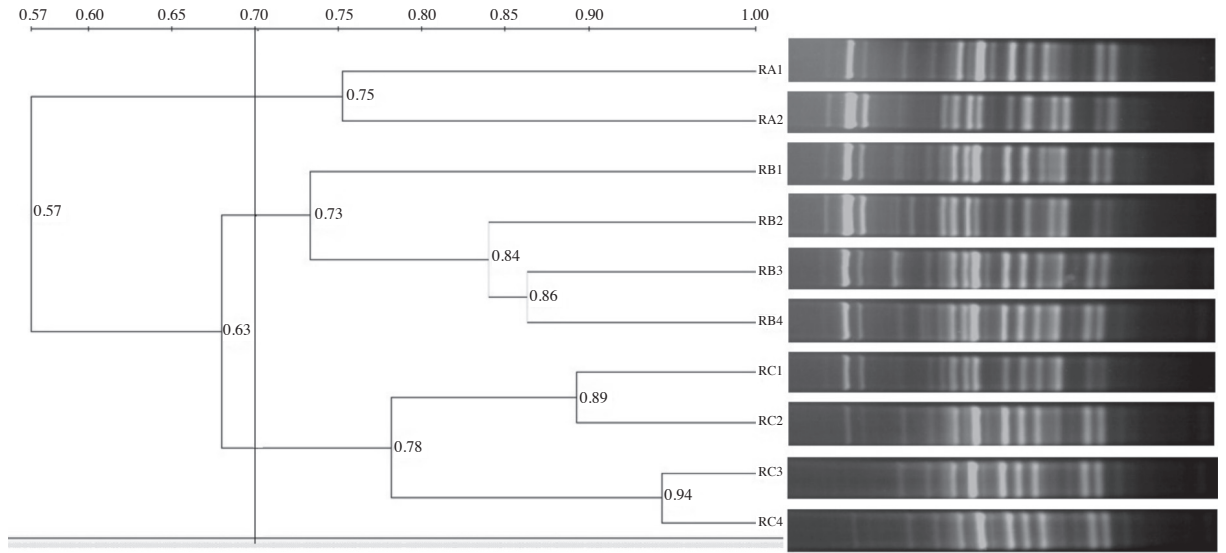
*E. faecium* izolatlarına ait vankomisin direnç ve virulans genlerinin sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** *Enterococcus faecium* izolatlarının antibiyotik direnç/duyarlılık oranları.

| Antibiyotikler | Dirençli (%) | Duyarlı (%) |
|----------------|--------------|-------------|
| Gentamisin     | 10 (27.03)   | 27 (72.97)  |
| Levofloksasin  | 31 (83.79)   | 6 (16.21)   |
| Streptomisin   | 10 (27.03)   | 27 (72.97)  |
| Teikoplanin    | 37 (100)     | 0 (0)       |
| Tetrasiklin    | 37 (100)     | 0 (0)       |
| Linezolid      | 0 (0)        | 37 (100)    |
| Norfloksasin   | 37 (100)     | 0 (0)       |
| Nitrofurantoin | 23 (62.16)   | 14 (37.84)  |
| Eritromisin    | 37 (100)     | 0 (0)       |
| Siprofloksasin | 37 (100)     | 0 (0)       |
| Ampisilin      | 37 (100)     | 0 (0)       |
| Penisilin G    | 37 (100)     | 0 (0)       |

**Tablo 2.** *Enterococcus faecium* izolatlarının vankomisin direnç ve virulans genleri.

| Vankomisin Direnç Geni/Virulans Geni | n (%)       |
|--------------------------------------|-------------|
| <i>van A</i>                         | 37 (%100)   |
| <i>van B</i>                         | 0           |
| <i>gelE</i>                          | 1 (%2.7)    |
| <i>asaI</i>                          | 0           |
| <i>Hyl</i>                           | 10 (27.03)  |
| <i>Esp</i>                           | 23 (%62.16) |
| <i>cylA</i>                          | 0           |



**Şekil 1.** *Enterococcus faecium* izolatlarına ait RAPD profilleri ve UPGMA ile oluşturulan dendrogram.

Biyofilm üretimi tüm izolatlarda gözlenmiştir. İzolatların tümünün *vanA* geni ve vankomisin-teikoplanin direnci ile karakterize *vanA* fenotipine sahip olduğu görülmüştür. *esp*, *gelE* ve *hyl* genleri sırasıyla %62.2, %2.7 ve %27 oranlarında bulunmuş, *vanB*, *asaI* ve *cylA* genleri ise hiçbir izolatta saptanmamıştır.

RAPD-PCR sonucunda izolatların 10 farklı RAPD profiline sahip olduğu görülmüştür. Yüzde 70 benzerlik esas alınarak 3 ana RAPD profil grubu (A-C) belirlenmiştir (Şekil 1). İzolatlar 3 ana tipte temsil edilmiştir: Tip A (n=2), tip B (n=4) ve Tip C (n=31). Genotipik olarak izolatların yakınlık derecesi değerlendirildiğinde,

*E. faecium* izolatlarında yakın gruplar arasında homojenite gözlenmiştir. *esp* geni taşıyan 23 izolatın tamamı RAPD-PCR genotiplendirmede tip C'de yer almaktadır.

## TARTIŞMA

Enterokoklar gastrointestinal ve genital sistemin florasında doğal olarak bulunduklarından yol açtıkları enfeksiyonlar çoğunlukla endojen kaynaklıdır. Bununla birlikte, hastadan hastaya direkt temas, hastane personeli aracılığı ve eşyalardan indirekt temas yoluyla da bulaş gerçekleşmektedir<sup>(18)</sup>. Enterokokların virulansına katkıda bulunan çeşitli genler vardır fakat virulans fak-



törleri ile patojenite ilişkisi henüz tam olarak bilinmemektedir<sup>(3,10)</sup>. *E. faecium*, horizontal gen transferiyle çoklu ilaç direncinden dolayı önemi gitgide artan bir patojendir<sup>(12)</sup>. Klasik virulans faktörlerinden olmasa da çoklu ilaç direnci, bakterinin yaşamda kalmasına ve çoğalmasına olanak sağlar<sup>(19)</sup>. Glikopeptidlere olan artan direnç tedavi başarısızlığı ve mortaliteyi artırmaktadır<sup>(2)</sup>. Artan antibiyotik direnci her zaman virulans faktörlerindeki artışla ilişkili değildir. Bu durum mikroorganizma zindeliğinin korunmasına yönelik olup, bakterinin antibiyotik direnci kazanırken virulans faktörlerini kaybetmesiyle ya da tersiyle gerçekleşir<sup>(20)</sup>. Direnç ve virulans faktörlerinin kazanılması mikroorganizmanın zindeliğini baskılayabilir. Özellikle fırsatçı patojenlerde çoklu direnç gösteren suşların sınırlı virulans özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir<sup>(3)</sup>. Vankomisine duyarlı suşlarda dirençli suşlara göre daha yüksek oranda virulans faktörlerinin bulunduğu da çalışmalarla gösterilmiştir<sup>(20)</sup>.

Biyofilm üretiminin enterokokların patojenitesinde önemli rolü vardır<sup>(11)</sup>. Biyofilm üretimi ve antibiyotik direnci arasında, biyofilm üreten suşların antibiyotiklere daha dirençli olduğu şeklinde bir ilişki olduğu belirlenmiştir<sup>(4)</sup>. Biyofilm oluşumunun spesifik bir gene bağlı olmadığı, bu fenotipin çeşitli genlerin birlikte çalışmasına bağlı olarak multifaktöriyel olduğu bildirilmiştir. Biyofilm oluşumunda etkin olan faktörlerden biri bakterinin sahip olduğu virulans genleridir. Bu genlerin birlikte çalışmalarının biyofilm oluşumunu desteklediği, genlerde ortaya çıkan mutasyonların ise bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğini azalttığı sanılmaktadır<sup>(3)</sup>.

*esp* genine sahip olan *E. faecium* suşlarında bu gene sahip olmayanlara nazaran konjugasyonun daha sık gerçekleştiği ve ampicilin, siprofloksasin ve imipenem daha dirençli oldukları görülmüştür<sup>(2,21)</sup>. *gelE* genine sahip bazı suşların jelatinaz üretmediği, *gelE* geninin ifadenmesinde başka genlerin de rolü olabileceği belirtil-

miştir. Bu durum enterokok virulansının açıklanmasını daha da güçleştirmektedir<sup>(3)</sup>. *esp* ve *gelE*'nin biyofilm oluşumu ile ilişkisi tartışmalıdır; bazı araştırmacılar bu genlerin biyofilm oluşumuna katkısı olmadığını savunurken bazıları aksini iddia etmektedirler<sup>(3,22-24)</sup>.

*VREfm* enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesi ve epidemiyolojisinin anlaşılmasında moleküler takip önemlidir<sup>(25)</sup>. PFGE enterokokların tiplendirilmesinde altın standarttır ve VRE salgınlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılan bir yöntemdir<sup>(26)</sup>. Hızlı ve maliyet etkin olması nedeniyle klonal ilişkinin gösterilmesinde RAPD de oldukça sık kullanılmaktadır. Bu yöntemin uzak ilişkili enterokok izolatlarının ve diğer Gram pozitif bakterilerin epidemiyolojik surveyansında kullanılabileceği bildirilmiştir<sup>(12)</sup>. Van den Braak ve ark.<sup>(27)</sup> VRE klinik izolatlarının genotiplendirilmesinde, RAPD ve PFGE'yi karşılaştırdıkları çalışmalarında birbiriyle uyumlu sonuçlara ulaşmışlar ve her iki yöntemin birbirlerinin alternatifi olabileceğini vurgulamışlardır. Aktaş ve ark.<sup>(18)</sup> 13 *VREfm* izolatı ile yaptıkları çalışmada, suşların tümünün *vanA* fenotipinde olup, vankomisin, teikoplanin ve yüksek düzey streptomisin direnci gösterdiğini ve yüksek düzey gentamisin direncinin ise %53 oranında görüldüğünü, linezolid ve nitrofurantoinin etkili antibiyotikler olduğunu bildirmişlerdir. RAPD-PCR yöntemi ile 4 profil saptamışlardır. Gülhan ve ark.<sup>(4)</sup> da RAPD-PCR ve antibiyotiplendirme ile *E. faecium* izolatlarının genotipik ve fenotipik olarak çeşitliliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda, RAPD analizi ile 10 farklı profil elde edilmiştir. İzolatların tamamı *vanA* (+) olup, *vanA* fenotipi sergilemiş, in vitro etkili antibiyotiğin henüz yaygın kullanılmayan linezolid olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, önceki çalışmalara<sup>(4,18)</sup> benzer şekilde poliklonal bir yayılım görülmektedir. Ancak RAPD profillerinin %70 benzerlik eşik değeri alınarak yapılan gruplan-

dırmasında *esp* geni taşıyan izolatların tamamının dominant tip olan tip C (n=31) içinde yer alması dikkat çekicidir. Bu durumda *esp* geni taşıyan izolatların genetik özellikler bakımından homojenite gösterdiğini söylenebilir. Salgınlardan tek bir klonun sorumlu olabileceği gibi genellikle glikopeptid dirençli enterokokların genetik çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir<sup>(25)</sup>. Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> 135'i vankomisine dirençli toplam 271 *E. faecium* izolatını inceledikleri çalışmada, *esp* gen pozitifliği ile vankomisin direnci arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir. İzolatlarımızın tümünün vankomisine dirençli olması ve *esp* oranının da nispeten yüksek oluşu bu genin bakterinin virulansında önemli olduğunu düşündürmektedir. VREfm suşlarında *esp* oranı çalışmamızda %62.2 olarak saptanırken, Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> %77, Comerlato ve ark.<sup>(3)</sup> %80, Kang ve ark.<sup>(6)</sup> da %80 olarak belirlemişlerdir. Comerlato ve ark.<sup>(3)</sup> vankomisine dirençli *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının PFGE ile belirledikleri alt klonları ve virulans faktörleri arasında bir ilişki belirleyememişlerdir. İzolatlar birbirinden farklı virulans profilleri sergilemişlerdir. Vankomisin direncinin virulans faktörlerinde bir artışa yol açmadığını, VREfm in bazı klonlarının yüksek oranda *esp* pozitifliği gösterdiğini ve bu genin virulans sürecinde önemli rolü olabileceğini belirtmişlerdir.

Thierfelder ve ark.<sup>(28)</sup> hastanelerinde 14 günlük bir sürede ortaya çıkan VREfm salgınında izole ettikleri suşların PFGE sonuçlarına göre poliklonal olduğunu ve tek bir merkez kökenli suşların epidemiyolojisinin karmaşık olduğunu ayrıca VREfm enfeksiyonu olan dört hastadan izole edilen suşların *esp* pozitif olduğunu görmüşlerdir. Diğer çalışmalarda da, hastane ortamında yaygın olan bazı klonların *esp* ile bağlantılı olduğu ve buradan yola çıkarak *esp*'nin bakterinin virulans sürecindeki katkısının büyük olduğu öne sürülmüştür<sup>(3,21)</sup>. Routs ve ark.<sup>(25)</sup> tarafından glikopeptid dirençli *E. faecium* salgın suşlarının tamamında *esp* pozitifliği saptanmış ve *esp*'nin

artmış virulansla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. *E. faecium* izolatlarının glikopeptid direncinin ortaya çıkışından önce de *esp* genine sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur<sup>(25)</sup>.

Baylan ve ark.<sup>(9)</sup> üriner enterokok izolatlarında antibiyotik direnç durumları ve virulans faktörlerini araştırdıkları çalışmalarında, *E. faecium* suşlarında *hyl* pozitifliğinin anlamlı derecede yüksek (%38.7), jelatinaz aktivitesinin düşük (%3.2) ve *esp* pozitifliğinin %6.5 oranında olduğunu saptamışlardır. *asaI* gen pozitifliği ve hemolizin üretimini belirlememişlerdir. Çalışmamızda, *hyl* (%27), *gelE* (%2.7), *esp* (%62.2) olarak saptanırken; *asaI* ve *cylA* genleri belirlenmemiştir. *gelE*, *asaI* ve *cylA*'nın *E. faecium*'da ender rastlanılan genler olduğu bildirilmiştir<sup>(29)</sup>. İzolatlarımızın hepsinde biyofilm üretimi gözlemlendiğinden *asaI*, *esp* ve *gelE*'nin biyofilm oluşumuna katkısı belirlenememiştir.

Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> enterokok yüzey proteini ve hyaluronidaz'ın *E. faecium* için spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Yatan hastalardan izole ettikleri 153'ü klinik, 118'i fekal toplam 271 adet *E. faecium* izolatında; *asaI*, *gelE* ve *cylA* genleri hiçbir izolatta belirlenememiş, VREfm arasında *hyl* pozitifliği %16, *esp* geni pozitifliği ise %77 olarak saptanmıştır. Ayrıca vankomisin dirençli klinik suşlardaki *esp* oranının (%92) fekal suşlardan (%73) daha yüksek olduğu belirlenmiştir<sup>(7)</sup>. Rice ve ark.'nın<sup>(30)</sup> çalışmalarında da aynı sonuç ortaya çıkmıştır. Çalışmamız sonuçlarına göre, *esp* oranının fekal örneklerde daha düşük (%58), diğer klinik örneklerde daha yüksek (%83) olduğu belirlenmiştir. *hyl* oranı ise incelenen diğer virulans faktörlerine göre daha yüksek (%27) bulunmuştur. Bu sonuçlar *esp*'nin *E. faecium*'un patojenitesinde etkili olduğunu göstermektedir.

Vankomisine dirençli enterokoklar içinde *E. faecium*'un önemi son yıllarda arttığından, virulans faktörlerinin ve genotipik özelliklerinin

çok merkezli ve kapsamlı çalışmalarla araştırılması patojenitesinin aydınlatılmasında yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Fernandes SC, Dhanashree B. Drug resistance & virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. Indian J Med Res. 2013;137(5):981-5.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 2009;155(6):1749-57. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
- Comerlato CB, de Resende MCC, Caierao J, D'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(5):590-5. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108052013009>
- Gülhan T, Boynukara B, Çiftci A, Söğüt MÜ, Fındık A. Determination of biofilm production, genotype and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus faecium* isolates originated from dog, cat and human. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2015;21(4):553-61. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.12956>
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3558-65. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3558-3565.2004>
- Kang M, Xie Y, He C, et al. Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu, China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(6):933-9. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2029-z>
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hly* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4473-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004>
- Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. Braz J Infect Dis. 2016;20(2):127-33. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.11.011>
- Baylan O, Nazik H, Bektöre B, ve ark. Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virülans faktörleri arasındaki ilişki. Mikrobiyol Bul. 2011;45(3):430-45.
- Lindenstrauss AG, Pavlovic M, Bringmann A, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Syst Appl Microbiol. 2011;34(8):553-60. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.05.002>
- Garsin DA, Willems RJL. Insights into the biofilm lifestyle of enterococci. Virulence. 2010;1(4):219-21. <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.12073>
- Banerjee T. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of multidrug resistant *Enterococcus faecium* urinary isolates from a Tertiary Care Centre, Northern India. J Clin Diagn Res. 2013;7(12):2721-3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6541.3742>
- Werner G, Willems RJL, Hildebrandt B, Klare I, Witte W. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1499-506. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1499-1506.2003>
- Furlaneto-Maia L, Rocha KR, Siqueira VLD, Furlaneto MC. Comparison between automated system and PCR-based method for identification and antimicrobial susceptibility profile of clinical *Enterococcus* spp. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(2):97-103. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200002>
- Çiftci A, Fındık A, İça T, Baş B, Onuk EE, Güngördü S. Slime production and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from arthritis in chickens. J Vet Med Sci. 2009;71(6):849-53. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.849>
- Yean CY, Yin LS, Lalitha P, Ravichandran M. A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species. BMC Microbiol. 2007;7:112. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-112>
- Huey B, Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. J Bacteriol. 1989;171(5):2528-32. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2528-2532.1989>
- Aktaş Z, Diyarbakırlı P, Bal Ç, et al. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşlarının fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. Mikrobiyol Bul. 2007;41(3):347-56.
- Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med Res. 2008;128(2):111-21.
- Banerjee T, Anupurba S. Prevalence of virulence factors and drug resistance in clinical isolates of enterococci: A study from North India. J Pathog. 2015;2015:692612. <https://doi.org/10.1155/2015/692612>
- Willems RJL, Bonten MJM. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. Curr Opin Infect Dis. 2007;20(4):384-90. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e32818be63d>
- Sillanpää J, Nallapareddy SR, Singh KV, et al. Characterization of the ebpfm pilus-encoding operon of *Enterococcus faecium* and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. Virulence. 2010;1(4):236-46. <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.11966>
- Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. J Bacteriol. 2007;189(22):8233-40. <https://doi.org/10.1128/JB.01205-07>
- Ballering KS, Kristich CJ, Grindle SM, Oromendia A, Beattie DT. Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. J Bacteriol. 2009;191(8):2806-14. <https://doi.org/10.1128/JB.01688-08>
- Routsi C, Platsouka E, Willems RJL, et al. Detection of enterococcal surface protein gene (*esp*) and amplified fragment length polymorphism typing of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a Greek intensive care unit. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5742-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5742-5746.2003>
- Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 2000;38(11):4242-5.
- Van den Braak N, Power E, Anthony R, Endtz HP, Verbrugh HA, Van Belkum A. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of SmaI DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. FEMS Microbiol Lett. 2000;192(1):45-52. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09357.x>
- Thierfelder C, Keller PM, Kocher C, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* A multiple-strain outbreak of eight weeks duration at a Swiss tertiary care hospital. Swiss Med Wkly. 2012;142:135-40. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13540>
- Worth LJ, Slavin MA, Vankerckhoven V, Goossens H, Grabsch EA, Thursky KA. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of *esp* and *hly* in Australian patients with haematological disorders. J Hosp Infect. 2008;68(2):137-44. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.10.017>
- Rice LB, Carias L, Rudin S, et al. A potential virulence gene, *hlyEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. J Infect Dis. 2003;187(3):508-12. <https://doi.org/10.1086/367711>

# Sivas Bölgesinde Servikal Örneklerde *Human papillomavirus* Sıklığı ve Genotip Dağılımı

Mürşit HASBEK<sup>®</sup>, Cem ÇELİK<sup>®</sup>, Aslı ÇABUK<sup>®</sup>, Mustafa Zahir BAKICI<sup>®</sup>

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas

## ÖZ

**Amaç:** Human Papillomavirüs (HPV), papillomaviridae ailesinde yer alan çift iplikli sirküler DNA içeren bir virüstür. Servikal kanserlerin % 99.7'sinde bulunduğu gösterilmiştir. Ülkemizden ve dünyanın değişik bölgelerinden yapılan çalışmalarda, farklı prevalans yüzdeleri elde edilmiştir. Çalışmamız, HPV'nin bölgemizdeki prevalansını ve tip dağılımını belirlemek amacıyla yöneliktir.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, Ocak 2015-Aralık 2017 tarihleri arasında Cumhuriyet Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran kadınların, servikal örneklerinde HPV DNA pozitifliği araştırılmıştır. Çalışmaya 14-83 yaş arası 368 kadın dâhil edilmiştir. Revers hibridizasyon ve PCR teknikleri kullanılmış, veriler geriye dönük olarak incelenmiştir.

**Bulgular:** Çalışmaya dâhil edilen 368 örnekte HPV DNA pozitifliği % 28.8 (n=106)'dır. En sık bulunan genotip ise yüksek riskli HPV 16'dır (%23.5). Otuz yaş altı kadınlardaki pozitiflik, 30 yaş üstü kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (p=0.009)

**Sonuç:** Ülkemizdeki HPV prevalansının doğru olarak belirlenebilmesi için, çok merkezli, daha geniş standardize edilmiş hasta ve kontrol grupları içeren çalışmalara gereksinim vardır.

**Anahtar kelimeler:** Servikal kanser, HPV DNA, genotip

## ABSTRACT

**The Frequency and Genotype Distribution of Human Papillomavirus in Cervical Specimens in Sivas Region**

**Objective:** Human Papillomavirus (HPV) contains a double-stranded circular DNA virus which belongs to the papillomaviridae family. It has been shown that it was found in 99.7% of cervical cancers. Different prevalence rates have been reported in studies conducted in our country and in different regions of the world. Our study aimed to determine the prevalence and the genotype distribution of HPV in our region.

**Material and Methods:** In this study, HPV DNA positivity of cervical specimens of women who applied to the outpatient clinic of Obstetrics and Gynecology, Cumhuriyet University Research and Application Hospital, between January 2015 and December 2017 were investigated. A total of 368 women aged between 14-83 years were included in this study. Reverse hybridization and PCR techniques were used. Data in our study were obtained retrospectively.

**Results:** HPV DNA positivity was 28.8% (n = 106) in 368 samples included in this study. The most common genotype was high-risk HPV genotype 16 (23.5%). The HPV DNA positivity in women under 30 years of age was statistically significantly higher than women over 30 years (p = 0.009).

**Conclusion:** In order to determine the HPV prevalence in our country accurately, there is a need for multi-centered studies with larger standardized patient and control groups.

**Keywords:** Cervical cancer, HPV DNA, genotype

## GİRİŞ

Human papillomavirüs (HPV), papillomaviridae ailesi içinde yer alan, zarfsız, çift iplikli DNA genomu içeren ikozahedral kapside sahip, 50-55

nanometre boyutlarında virüslerdir. Bugün için 100'ün üzerinde HPV tipi tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar insan HPV'nin onkojenik potansiyelini ortaya çıkarmıştır. HPV 16 ve HPV 18 servikal papillomalara ve displaziye

**Alındığı tarih:** 30.05.2018

**Kabul tarihi:** 24.07.2018

**Yazarların ORCID bilgileri:**

Mürşit Hasbek 0000-0002-5217-8607 Cem Çelik 0000-0002-7141-5874

Aslı Çabuk 0000-0003-3203-6537 Mustafa Zahir Bakıcı 0000-0003-3823-0007



neden olmakta ve servikal karsinomaların en az % 85'i entegre HPV DNA içermektedir<sup>(1)</sup>. Servikal ve anal kanserle ilişkili onkojenik yüksek riskli HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 76, 82 olarak bildirilmiştir. Olası yüksek riskli HPV tipleri 26, 53, 66'dır. Kanser açısından düşük riskli olanlar ise 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62'dir<sup>(2,3)</sup>.

Serviks kanseri, tahmini olarak yılda 500.000 civarı yeni olgu oluşumunun yanı sıra yılda yaklaşık 250.000 ölüme yol açan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Yine tüm dünyada kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ise 4. sırayı almaktadır<sup>(4)</sup>. En sık 50-59 yaş arasında görülmekle birlikte ülkemiz koşullarında invaziv serviks kanserlerinin %65'i 40-60 yaş grubunda görülmektedir<sup>(5)</sup>.

Serviks kanseri günümüzde tarama testi ile erken tanı konulabilen ve aşı ile profilaktik koruma sağlanabilen bir kanser türüdür. Pap Smear olarak isimlendirilen tarama testleri ile serviks sitolojileri değerlendirilebilmektedir<sup>(6)</sup>. Hastalıktan korunmada ise profilaktik bivalan (HPV 16 ve 18 içeren) ve kuadrivalan (HPV 6, 11, 16, 18 içeren) aşılardan yüksek oranda koruyuculuk sağladığı belirlenmiştir. Terapötik aşılardan ise enfeksiyon veya neoplazi varlığında tedavi amaçlı uygulanırlar<sup>(7)</sup>.

Korunulabilir bir kanser türü olan serviks kanseri etyolojisinde yer alan HPV'nin, genel olarak prevalansının ve tiplerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu konudaki bilgilerin güncellenmesi için sürekli yeni verilere gereksinim duyulmaktadır. Çalışmamızda, bölgemizdeki HPV prevalansının ve tip dağılımının belirlenerek, bu konudaki literatüre katkı sunulması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Ocak 2015-Aralık 2017 tarihleri

arasında, Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran ve servikal örneklerde rutin tarama amaçlı HPV DNA istemi yapılmış olan, 368 hastanın verileri geriye dönük olarak incelenmiştir.

Hastaların servikal örnekleri Female Swab Specimen Collection Kiti (HybriBio, Hong Kong) kullanılarak alınmıştır. Hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda DNA izolasyonu HPV GenoArray Test Kiti (HybriBio, Hong Kong) ile yapılmıştır. Amplifikasyon için HybriBio PCR kitleri kullanılmış ve Otomatize HybriMax (HybriBio, HongKong) cihazında HybriBioMemHPV21 membran stripleri ile çalışma tamamlanmıştır. Kullanılan test kitinin belirleyebildiği tipler ve risk sınıflandırması test prosedüründe, altı adet düşük riskli (6, 11, 42, 43, 44, 81), on beş adet yüksek riskli tip (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) olarak tanımlanmış olup, 21 adet tip belirleme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Bulguların değerlendirmesi de üretici firmanın belirlediği tipler ve risk sınıflamasına göre yapılmıştır.

Sonuçlarımız SPSS 23.0 programında, ki-kare testi ve iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmamızda, numune alınan kadınların yaş aralığı 14-83 ( $40 \pm 11$ ) idi. Çalışmaya dâhil edilen 368 örneğin 106'sında (%28.8) HPV DNA pozitifliği saptanmıştır. HPV DNA pozitif örneklerden %63.2'sinde ( $n=67$ ) yüksek riskli bir genotip belirlenirken, %13.2'sinde ( $n=14$ ) düşük riskli bir genotip belirlenmiş, %19.8'inde ( $n=21$ ) iki veya daha fazla yüksek riskli genotip birlikte saptanmış, %3.8'inde ( $n=4$ ) ise hem yüksek



riskli hem de düşük riskli genotipler birlikte saptanmıştır. Yüksek riskli genotipler için, birden fazla genotip tayin edilen örnekler de dikkate alındığında pozitif örnekler içinde yüksek riskli genotip oranı % 86.7 (n=92) olarak saptanmıştır. HPV DNA pozitifler (n=106) içinde en fazla bulunan tip ise % 13.2 (n=14) ile genotip 16'dır. Genotip 16 için birden fazla genotip tayin edilen örnekler de dikkate alındığında ise pozitif örnekler içindeki oranı % 23.5 (n=25)'e ulaşmaktadır. Tiplere göre dağılım ve pozitif örnekler içindeki yüzdesi Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1. HPV DNA pozitif örneklerin genotip dağılımı.**

| Genotip                                     | Sıklık (n) | Oran (%) |
|---------------------------------------------|------------|----------|
| HPV 16                                      | 14         | 13.2     |
| HPV 39                                      | 9          | 8.5      |
| HPV 53                                      | 9          | 8.5      |
| HPV 6                                       | 7          | 6.6      |
| HPV 31                                      | 5          | 4.7      |
| HPV56                                       | 5          | 4.7      |
| HPV 11                                      | 4          | 3.8      |
| HPV 33                                      | 4          | 3.8      |
| HPV 35                                      | 4          | 3.8      |
| HPV 51                                      | 4          | 3.8      |
| HPV 44                                      | 3          | 2.8      |
| HPV 58                                      | 3          | 2.8      |
| HPV 45                                      | 2          | 1.9      |
| HPV 52                                      | 2          | 1.9      |
| HPV 59                                      | 2          | 1.9      |
| HPV 68                                      | 2          | 1.9      |
| HPV 18                                      | 1          | 0.9      |
| HPV 66                                      | 1          | 0.9      |
| Yüksek riskli birden fazla genotip          | 21         | 19.8     |
| Yüksek ve düşük riskli birden fazla genotip | 4          | 3.8      |
| Toplam                                      | 106        | 100      |

Kuadrivalan aşılar içinde yer alan ve en çok üzerinde durulan genotiplerden yüksek riskli HPV 18 ise tüm örnekler içinde yalnızca 1 adet saptanmıştır. HPV 6, tek genotip saptanan örnekler için %6.6 ile (n=7) çalışmamızda en sık bulunan düşük riskli genotip olmuştur. Yine birden fazla genotip saptanan örnekler de dikkate alındığında, Genotip 6 için pozitif örnekler içindeki oran %11.3 olmuştur (n=12). HPV 11 ise

%3.8 (n=4) ile düşük riskli genotipler içinde ikinci sırayı almıştır.

Yaşa göre değerlendirme yaptığımızda, hastalar 30 yaş ve altı, 30 yaş üstü şeklinde iki grupta toplanmıştır. 30 yaş ve altı grubunda HPV DNA pozitifliği yüzdesi (%41.8), 30 yaş üstü grubunun pozitifliğine (%25.9) göre anlamlı derecede (p=0.009) yüksek bulunmuştur (Tablo 2). Yaşa göre HPV DNA pozitifliği Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2. Yaş gruplarına göre HPV DNA pozitifliği.**

| Yaş            | Pozitif (n/%) | Negatif (n/%) | Toplam (n/%) |
|----------------|---------------|---------------|--------------|
| 30 yaş ve altı | 28/41.8       | 39/58.2       | 67/100       |
| 30 yaş üstü    | 78/25.9       | 223/74.1      | 301/100      |
| Toplam         | 106/28.8      | 262/72.2      | 368/100      |

p=0.009

## TARTIŞMA

HPV enfeksiyonunun prevalansı seçilen yöntem, hasta grubu, sosyoekonomik düzey ve örnek kalitesi gibi değişkenlere bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Değişik ülkelerde ve ülkemizde yapılan çalışmalarda, HPV prevalansı için farklı değerler elde edilmiştir. On dört Avrupa ülkesinden verilerin toplandığı geniş çaplı bir meta analizde, HPV DNA pozitifliği için en düşük oran %2.2 ile İspanya'da gözlenirken, %22.8 ile Danimarka en yüksek oranda pozitifliğin belirlendiği ülke olmuştur<sup>(8)</sup>. Bu çalışmada yüksek riskli HPV genotiplerinin yaygınlığı 16 ve 18 için sırasıyla ortalama %29.8 ve %12 bulunmuştur<sup>(8)</sup>.

Güney Amerika, Asya, Avrupa ve Afrika olmak üzere toplam 11 ülkeden 18.498 kadının yaş gruplarına göre HPV yaygınlığının değerlendirildiği çalışmada, en düşük oran %1.6 ile Vietnam da saptanırken, en yüksek oran 15-24 yaş arası kadınlarda Nijerya'da (%30.8) saptanmıştır<sup>(9)</sup>. Bu çalışmada, bazı bölgelerde yüksek riskli

HPV varlığının (Hollanda, Arjantin ve Meksika) 35 yaş altındaki kadınlar arasında önem kazandığı bildirilirken, başka yerlerde 35 yaş altı veya üstünün yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyonda önemli olmadığı vurgulanmıştır<sup>(9)</sup>.

Dünyanın farklı bölgelerinden 78 çalışmanın incelendiği ve normal servikal sitolojiye sahip 157.879 örneğin test edildiği geniş çaplı bir meta analizde HPV'in tüm dünyada prevalansının %10.4 olduğu, en yüksek prevalans %31.6 ile Batı Afrika'da, en düşük prevalans ise %6.2 ile Güneybatı Asya'da olduğu saptanmıştır<sup>(10)</sup>. Bu çalışmada gelişmiş ülkelerde ortalama prevalansın tahmini olarak %10, az gelişmiş ülkelerde ise %15.5 olduğu bildirilmiştir<sup>(10)</sup>.

Çalışmamız yukarıdaki meta analizlerle karşılaştırıldığında en yüksek prevalans saptanan bölgelere yakın oranların elde edildiği görülmüştür. Ancak çalışmamızın hasta grubu seçiminde servikal sitoloji değerlendirilmemiştir. Yukarıdaki meta analizlerin ikisinde<sup>(8,9)</sup> bu konu belirtilmemiş, De Sanjose ve ark.'nın<sup>(10)</sup> yaptığı çalışmada ise, normal servikal sitolojiye sahip örnekler çalışmaya dâhil edilmiş olduğu için, karşılaştırma ancak göreceli olarak nitelendirilebilir.

Zhou ve ark.'nın<sup>(11)</sup> yaptığı 303 makalenin analiz edildiği 1991-2016 arasını kapsayan bir çalışmada, HPV 16 sıklık olarak ilk sırada bulunurken, ikinci sırayı HPV 18 almıştır. Çinli kadınlarda 20-24 yaş arasında HPV prevalansının (%24.3) pik yaptığı belirtilirken 45-55 yaş aralığında, az gelişmiş bölgelerde prevalansın ikinci pik değerine ulaştığı belirtilmiştir.

Ülkemizde beş farklı bölgeden normal servikal sitolojiye sahip 587 (15-68 yaş) sağlıklı kadın üzerinde yapılmış bir çalışmada ise, HPV pozitifliği %17.9 olarak bulunmuştur<sup>(12)</sup>. HPV 16 genotip tayininde çalışmamıza benzer şekilde ilk sırayı alırken, HPV 6 ikinci sıklıkta saptan-

mıştır. Bu çalışmada, HPV prevalansının en yaygın olduğu yaş grubu ise 25-29 (%31.8) olarak belirlenmiştir<sup>(12)</sup>. Yine ülkemizde yapılmış görece yüksek örnek sayısına sahip bir çalışmada, 507 örnek incelenmiş verileri tamamlanabilen 403 örnek üzerinden değerlendirme yapılmıştır<sup>(13)</sup>. Tüm hasta grubunda HPV pozitifliği % 23 olarak bulunurken, normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda bu oran % 20, anormal servikal sitoloji saptananlarda ise %36'dır. Genotip tayininde yine ilk sırayı HPV 16 (%34) alırken, HPV 6 (%17) ikinci sıklıkta saptanmıştır. Araştırmacılar, çalışmamıza benzer şekilde 30 yaş altı kadınlarda HPV pozitifliğini (%34), 30 yaş üstü kadınlara göre (%20) istatistiksel olarak anlamlı (p=0.005) derecede yüksek bulduklarını dile getirirlerken, takip eden diğer on yıllarda önemli bir fark olmadığını belirtmişlerdir<sup>(13)</sup>.

Beyazıt ve ark.'nın<sup>(14)</sup> yaptığı ve 201 örnek sonucunu geriye dönük incelediği yakın tarihli bir çalışmada, 91 hastada (%45.2) HPV pozitifliği saptanmış olup, çalışmamızdan daha yüksek bir pozitiflik oranı bildirilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde en fazla bulunan genotip HPV 16 (%16.5) olmuştur. Düşük riskli genotiplerde ise yine çalışmamıza benzer şekilde en fazla HPV 6 (%11) saptanmıştır.

Çalışmamızda, ülkemizde yapılan bazı çalışmalara göre daha yüksek HPV prevalans yüzdesi elde edilmiştir. En sık görülen genotip ise HPV 16 olarak gözlenmektedir. Prevalans oranı ve en sık görülen genotip açısından sırasıyla; Fındık ve ark.'nın<sup>(15)</sup> yaptığı çalışmada %19.2 ile HPV 16, Akçalı ve ark.'nın<sup>(16)</sup> çalışmasında %8.5 ile HPV 16 ve Külhan ve ark.'nın<sup>(17)</sup> çalışmasında ise % 2.79 ile HPV 16 olarak saptanmıştır.

Dünya'nın farklı bölgelerinden yapılan çalışmalarda da HPV DNA için farklı prevalans yüzdeleri bildirilmiştir. Jamdar ve ark.'nın<sup>(18)</sup> İran'dan yaptığı çalışmada, prevalans %10.3 ile HPV 16

en sık genotip olarak bildirilmiştir. Prevalans yüzdesi ve en sık görülen genotip açısından araştırmacılar; Bulgaristan'dan %29.8 ile HPV 16, Nijerya'dan %36.5 ile HPV 31, Amerika Birleşik Devletleri'nden %14.7 ile HPV 56/59/66, Çin'den %19.8 ile HPV 16 sonuçlarını bildirmişlerdir<sup>(19-22)</sup>. Çalışmalardaki farklı sonuçlar; bölgesel ve sosyoekonomik değişkenler, örnek gruplarının farklı olması, hastalardaki servikal sitolojik değerlendirmenin dikkate alınıp alınmadığı, çalışılan yöntemlerin farklılığı gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir. Çalışmaların sonuçlarından da görüldüğü üzere HPV prevalansı ve genotip dağılımlarının bölgesel farklılıklar gösterebildiği anlaşılmaktadır.

Mudini ve ark'nın<sup>(23)</sup> Zimbabve'de yaptığı %49.5'i HIV pozitif olan 107 kadının dâhil edildiği bir çalışmada HPV pozitifliği %94 olarak belirlenmiş. HPV pozitifliğinin %94 gibi bir orana ulaşması, ek risk faktörlerinin hastalığın yayılımı konusunda ne derece etkin olabileceğini göstermesi açısından çarpıcıdır.

Yukarıda örneklediğimiz çalışmalardan elde edilen verilerle birlikte, çalışmamızdan edindiğimiz bilgiler, HPV için prevalans çalışmalarında seçilen hasta grubu, çalışılan yöntem, bölge ve yaş grupları faktörlerinin yanı sıra, hastalar için ek risk faktörlerinin de önemli olduğunu göstermektedir. Pratik uygulamada bu saydığımız faktörlerin hepsini standardize etmek oldukça zordur. Çalışmamızın da geriye dönük olması ve hastane otomasyon sistemlerinden yeterli veri sağlanamaması nedeniyle, servikal sitolojik korelasyon değerlendirmesi yapılamamıştır.

Çalışmamız sonucunda ve örneklediğimiz çalışmalardaki birçok ulusal ve uluslararası verilerden yola çıkarak, HPV enfeksiyonunun ülkemiz için de önemli bir halk sağlığı sorunu olduğu anlaşılmaktadır. Bu virüsün yol açtığı hastalıklardan birinin de servikal kanser olması önemini özellikle artırmaktadır. Aşı ile önlenabilir bir

kanser türü olması nedeniyle HPV'nin rutin aşılama programına dâhil olduğu ülkelerle karşılaş-tırmalı çalışmaların yapılıp, HPV'nin de resmi aşılama programına dâhil edilmesinin uygun olabileceği düşünülmektedir. Ülkemizdeki HPV prevalansının doğru olarak belirlenebilmesi için çok merkezli, yeterli örnek sayısına sahip, standardize edilmiş hasta ve kontrol grupları içeren çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmamızda sunulan verilerin bölgemizdeki HPV prevalansının ve tip dağılımının belirlenmesi konusunda literatüre katkı sunacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Murray R. Klinik Mikrobiyoloji. Çeviri Editörü Ahmet Başustaoglu, Atlas Kitapçılık, Ankara. 2010; 499-502
2. Avcı G, Bozdayı G, İnsan papilloma virüsü. Kafkas J Med Sci. 2013;3(3):136-44. <https://doi.org/10.5505/kjms.2013.52724>
3. Burd EM. Human papillomavirus laboratory testing: the changing paradigm. Clin Microbiol Rev. 2016;29(2):291-319. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-15>
4. Luttmer R, De Strooper LM, Steenbergen RD, et al. Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(9):961-74. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1217157>
5. Mavi Aydoğdu SG, Özsoy Ü. Serviks kanseri ve HPV. Androl Bul. 2018;20(1):25-9. <https://doi.org/10.24898/tandro.2018.62533>
6. Cruickshank ME. The role of human papillomavirus in risk management. Rev Gynecol Pract 2003;3(4):229-33. [https://doi.org/10.1016/S1471-7697\(03\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S1471-7697(03)00057-1)
7. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol. 2002;55(4):244-65.
8. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. Eur J Cancer. 2009;45(15):2632-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.07.019>
9. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. Int J Cancer. 2006;119(11):2677-84. <https://doi.org/10.1002/ijc.22241>
10. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2007;7(7):453-9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70158-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70158-5)
11. Zhou HL, Zhang W, Zhang CJ, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in Chinese women between 1991 and 2016: A systematic review. J Infect. 2018;76(6):522-8.

- <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.02.008>
12. Demir ET, Ceyhan M, Simsek M, et al. The prevalence of different HPV types in Turkish women with a normal Pap smear 2012. *J Med Virol*. 2012;84(8):1242-7.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.23333>
  13. Polat D, Süheyla S, Arslan H, Kuşçu E, Ayhan A, Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infect Dis*. 2009;9:191.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-191>
  14. Beyazit F, Silan F, Gencer M, Aydın B, et al. The prevalence of human papillomavirus (HPV) genotypes detected by PCR in women with normal and abnormal cervico-vaginal cytology. *Ginekol Pol*. 2018;89(2):62-7.  
<https://doi.org/10.5603/GP.a2018.0011>
  15. Fındık D, Türk Dağı H, Arslan U, Fındık Y. Servikal örneklerde human papillomavirus sıklığı ve genotip dağılımı. *Genel Tıp Derg*. 2012;22(4):116-20.
  16. Akcali S, Goker A, Ecemis T, Kandiloglu AR, Sanlidag T. Human papilloma virus frequency and genotype distribution in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(1):503-6.
  17. Kulhan M, Kulhan NG, Seven Y, et al. Estimation of the prevalence and distribution of HPV genotypes and identification of related risk factors among Turkish women. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2017;21(3):218-23.  
<https://doi.org/10.5114/wo.2017.69591>
  18. Jamdar F, Farzaneh F, Navidpour F, et al. Prevalence of human papillomavirus infection among Iranian women using COBAS HPV DNA testing. *Infect Agent Cancer*. 2018;25;13:6.  
<https://doi.org/10.1186/s13027-018-0178-5>
  19. Kovachev S, Slavov V. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Bulgaria: A 2017 update. *J Med Virol*. 2018;90(6):1142-9.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.25050>
  20. Okunade KS, Nwogu CM, Oluwole AA, Anorlu RI. Prevalence and risk factors for genital high-risk human papillomavirus infection among women attending the out-patient clinics of a university teaching hospital in Lagos, Nigeria. *Pan Afr Med J*. 2017;28:227.  
<https://doi.org/10.11604/pamj.2017.28.227.13979>
  21. StolerMH, Wright TC Jr, Parvu V, et al. The Onclarity Human Papillomavirus Trial: Design, methods, and baseline results. *Gynecol Oncol*. 2018;149(3):498-505.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.04.007>
  22. Zhao P, Liu S, Zhong Z, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection among women in northeastern Guangdong Province of China. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):204.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-018-3105-x>
  23. Mudini W, Palefsky JM, Hale MJ, et al. Human papillomavirus genotypes in invasive cervical carcinoma in HIV seropositive and seronegative women in Zimbabwe. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018; (bas-kıda)  
<https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001754>

# Dört Yıllık Süreçte Bir Üniversite Hastanesindeki Tüberküloz Dışı Mikobakterilere Ait İzlem<sup>§</sup>

Müge Hacer ÖZKARATAŞ<sup>®</sup>, Nuran ESEN<sup>®</sup>, Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK<sup>®</sup>

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

## ÖZ

**Amaç:** Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) çevrede yaygın olarak bulunur ve özellikle immün sistemi baskılanmış insanlarda etken olarak izole edilmektedir. Klasik tüberküloz ilaçlarına büyük oranda dirençli olmaları ve giderek artan sıklıkta izole edilmeleri nedeniyle TDM enfeksiyonlarının doğru ve erken tanısı tedavi başarısı açısından çok önemlidir. Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde 2012-2016 yılları arasında Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda çalışılmış ve TDM saptanmış örneklerden elde edilen sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiş ve yıllar içindeki değişim incelenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na gelen örnekler Löwenstein-Jensen, BACTEC MGIT 960 kültür sistemleri ile çalışılmıştır. Klinik istem olması durumunda bu yöntemler ile TDM saptanan izolatların tür tanımlaması GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Almanya) ile yapılmıştır. Birden fazla kültüründe aynı türün ürediği hastalara ait izolatlar etken kabul edilmiştir.

**Bulgular:** 2012-2016 yılları arasında laboratuvara gelen 11.804 örnekten, 299'unda TDM üremesi gözlenmiş ve 66'sına tür tanımlaması yapılmıştır. TDM'lerin sıklık sırasına göre tür dağılımında; 41 örnekte Mycobacterium fortuitum ilk sırada gözlenmiş, 11 örnekte Mycobacterium abscessus, altı örnekte Mycobacterium chelonae, beş örnekte Mycobacterium gordonae, iki örnekte Mycobacterium intracellulare ve bir örnekte Mycobacterium kansasii saptanmıştır.

**Sonuç:** TDM saptanan hastalar örnek alım bölgelerine göre incelendiğinde akciğer örneklerinin çoğunluğu oluşturduğu görülmektedir. Tür tanımlaması yapılan TDM'ler incelendiğinde hızlı üyen mikobakterilerin ön planda olduğu dikkat çekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Tüberküloz dışı mikobakteri, tanı, tür tanımlaması

## ABSTRACT

**The Surveillance of Non-Tuberculous Mycobacteria in a Four Year Period at a University Hospital**

**Objective:** Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are common in the environment and they are isolated as an etiological agent, especially in immunocompromised patients. Due to their frequent resistance to classical anti-tuberculosis drugs and their increasing frequency of isolation, accurate and early diagnosis of NTM infections is very important in terms of treatment success. The aim of this study was to evaluate retrospectively the results obtained from the samples of NTM diagnosed in the Mycobacteriology Laboratory of Dokuz Eylül University Hospital between 2012-2016 and changes over the years were analyzed.

**Material and Methods:** The samples sent to mycobacteriology laboratory were studied with Löwenstein-Jensen culture media, and BACTEC MGIT 960 systems. In case of clinical request, identification of NTM isolates at species level was performed by using a commercial line-probe assay (GenoType Mycobacterium CM; Hain Lifescience, Germany). If the same NTM species was isolated more than once in the clinical specimen of a patient, then it was considered as a causative agent.

**Results:** Out of 11804 clinical specimens sent to the laboratory with the initial diagnosis of tuberculosis in the period 2012 and 2016, NTM were identified in 299 samples. Species identification by GenoType Mycobacterium CM was performed on 66 of the NTM strains. The most frequently identified NTM species was Mycobacterium fortuitum (n=41), followed by Mycobacterium abscessus (n=11), Mycobacterium chelonae (n=6), Mycobacterium gordonae (n=5), Mycobacterium intracellulare (n=2) and Mycobacterium kansasii (n=1).

**Conclusion:** Respiratory tract specimens were the most common specimens when NTM isolated samples were evaluated according to sampling sites. As a striking feature, rapidly growing NTM species were the most frequent species isolated in our laboratory.

**Keywords:** Non-tuberculous mycobacteria, identification, species identification

## GİRİŞ

Tüberküloz dışı mikobakteri (TDM)'ler çevrede yaygın olarak bulunan 160'dan fazla farklı türü içermekte ve tür dağılımı coğrafi farklılıklar

göstermektedir<sup>(1)</sup>. Hem sağlıklı hem de bağışıklığı baskılanmış kişilerde başta akciğer olmak üzere lenf nodları, cilt, yumuşak dokular, iskelet sistemi gibi birçok sistemde hastalık oluşturalabilirler<sup>(1,2)</sup>.

**Alındığı tarih:** 08.05.2018

**Kabul tarihi:** 02.08.2018

**Yazışma adresi:** Müge Hacer Özkarataş, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>§</sup> Bu araştırma, 37.Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (16-20 Kasım 2016, Antalya) poster olarak sunulmuştur.

**Yazarların ORCID bilgileri:**

Müge Hacer Özkarataş 0000-0001-8897-0121 Nuran Esen 0000-0001-9796-3003 Ayşe Aydan Özkütük 0000-0002-1710-2287



Doğal su kaynakları, hastane ve binaların sıcak su sistemleri ile çeşitli hayvanlar TDM'ler için kaynak olabilmektedir<sup>(2)</sup>. İnsandan insana bulaş ise gösterilememiştir<sup>(1)</sup>.

Geçmişte hastalık etkeni olarak değerlendirilmeyen TDM'lerin, günümüzde bağışıklık sistemini baskılayan hastalık ve tedavilerin artmasına bağlı olarak giderek artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak izole edildiği görülmektedir<sup>(3,4)</sup>.

Tür düzeyinde tanımlanmamış bir TDM izolatu-  
nın klinik önemini belirlemek zorluk yarata-  
bilmektedir<sup>(1)</sup>. TDM'lerin tanımlanması bu  
etkenlerin birçoğunun geleneksel birinci seçe-  
nek antitüberküloz ajanlara dirençli olmaları  
nedeniyle de gereklidir<sup>(3)</sup>. Ayrıca TDM'lerin tür-  
lerine bağlı olarak da tedavi seçenekleri de-  
ğiştiğinden tür tayini önem kazanmaktadır<sup>(1)</sup>.

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastane-  
si Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji  
Birimi'ne 2012-2016 yılları arasında tüberküloz  
şüphesi ile gönderilen örneklerden izole edilen  
TDM'lerin belirlenmesi, tür düzeyindeki da-  
ğılım sıklığı ve örneklerle göre dağılım durumunun  
retrospektif olarak incelenmesi amaçlanmakta-  
dır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Örnek seçimi:** 2012-2016 yılları arasında Dokuz  
Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratu-  
varı Mikobakteriyoloji Birimi'ne tüberküloz  
şüphesi ile gönderilen tüm örnekler çalışmaya  
dahil edilmiştir.

**Örneklerin işlenmesi ve kültür:** Dokuz Eylül  
Üniversitesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na  
gelen örneklerden, steril olmayan klinik örnek-  
lerin homojenizasyon ve dekontaminasyonu  
N-asetil-L-sistein ve %4'lük sodyum hidroksit  
yöntemine dayanan Mycoprosafe® (Salubris,  
Türkiye) ticari kiti kullanılarak yapılmıştır. Steril

olduğu kabul edilen örneklerle dekontaminasyon  
işlemi uygulanmamıştır. Hazırlanan örnekler-  
den, katı besiyeri olarak Löwenstein-Jensen (LJ)  
besiyeri (Becton Dickinson, ABD) ve sıvı besi-  
yeri olarak "Mycobacteria Growth Indicator  
Tube" (MGIT) kullanılarak (Becton Dickinson,  
ABD) üretici talimatlarına göre ekim yapılmış-  
tır. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar  
Kinyoun yöntemi ile boyanmış ve aside dirençli  
basil (ARB) varlığı açısından ışık mikroskobun-  
da değerlendirilmiştir. LJ besiyerlerinin üreme-  
leri sekiz hafta boyunca haftada bir kez kontrol  
edilerek, sıvı besiyerleri BACTEC MGIT 960  
(Becton Dickinson, ABD) sistemi ile 37°C'de  
altı hafta inkübe edilerek sürdürülmüştür. Bu  
süre sonunda üreme olmayan örnekler negatif  
olarak değerlendirilmiştir. Üreme olan besiyer-  
lerinden hazırlanan yayma preparatların mikros-  
kobik incelemesinde ARB görülmesi durumun-  
da *Mycobacterium tuberculosis* kompleks  
(MTK) ile TDM ayrımı amacıyla MTK'ye ait  
MPT64 antijenini saptamaya yönelik bir test  
olan "TBC Identification Test" (Becton Dickin-  
son, ABD) üretici talimatlarına göre uygulanmış  
ve yorumlanmıştır. Klinik istem olması duru-  
munda TDM olarak belirlenen izolatların tür  
tayini amacıyla sık izole edilen türleri belirleme-  
ye yönelik hibridizasyon temeline dayanan  
"GenoType *Mycobacterium* CM" (Hain  
Lifescience, Almanya) ticari kiti üretici talimat-  
larına göre kullanılmıştır. Üç aşamalı bu testte,  
sıvı veya katı besiyerinde üremiş mikobakteriler  
kullanılarak yapılan DNA ekstraksiyonu sonrası  
biotinlenmiş primerler kullanılarak amplifikas-  
yon sağlanmıştır. Son basamakta ters hibridizas-  
yon ile strip üzerinde oluşan bant paternlerine  
göre tiplendirme tamamlanmıştır.

Birden fazla kültüründe aynı türün ürettiği has-  
talara ait izolatlar etken kabul edilmiştir. TDM  
sayısı belirlenirken aynı hastaya ve aynı örnek  
alım bölgesine ait yineleyen örnekler göz ardı  
edilmiştir.

Analizler için OpenEpi (Ver.2008, Atlanta, ABD) programı kullanılmıştır. Toplam çalışılan örnek sayısı ve TDM saptanan örnek sayılarının yıllar arasındaki değişimi çok gözlü ki kare testi ile analiz edilmiştir. Bulunan anlamlılığın hangi ardışık yıllar arasında olduğunu saptamak amacıyla ikili karşılaştırmalar yapılmıştır.

## BULGULAR

2012-2016 yılları arasında laboratuvara gelen

11.804 örnekten, 299'unda (%2.53) TDM üremesi gözlenmiştir. Klinik istem ile tür tanımlaması yapılan TDM'lerin türlere göre dağılımı sıklık sırasına göre; 41 örnekte *M. fortuitum* (%62), 11 örnekte *M. abscessus* (%17), altı örnekte *M. chelonae* (%9), beş örnekte *M. gordonae* (%7.5), iki örnekte *M. intracellulare* (%3) ve bir örnekte *M. kansasii* (%1.5) şeklinde belirlenmiştir. TDM'lerin örneklere ve yıllara göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Tür tanımlaması yapılan TDM'lerin türlere ve yıllara göre dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.

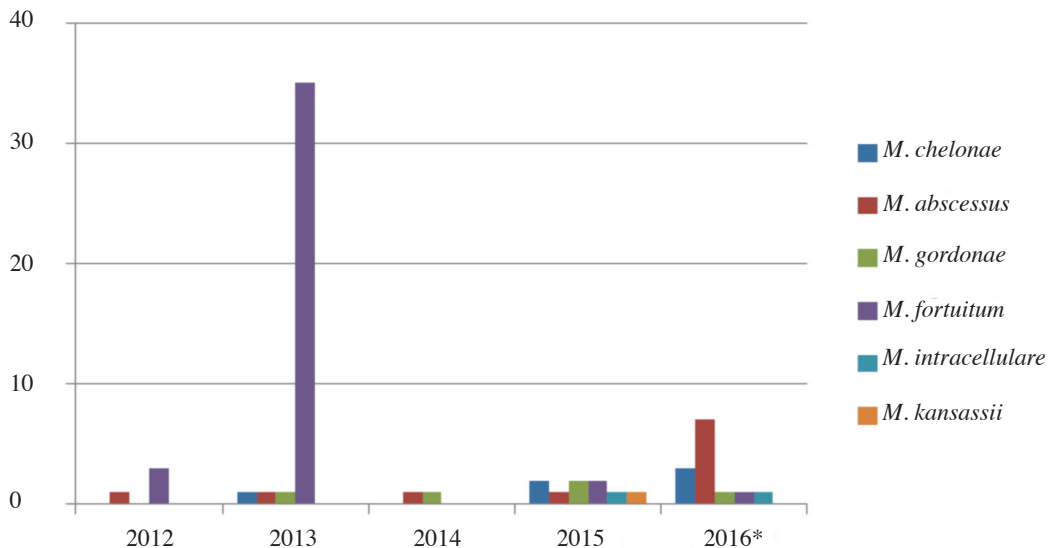
Tablo 1. TDM'lerin örnek türlerine ve yıllara göre dağılımı.

| Yıl    | Çalışılan Örnekler<br>n | TDM Saptanan Örnekler<br>n (%) | Tür Tanımlaması Yapılan TDM'ler<br>n | Örnek Alım Bölgeleri                |                                         |
|--------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
|        |                         |                                |                                      | Akciğer Örnekleri <sup>a</sup><br>n | Akciğer Dışı Örnekler <sup>b</sup><br>n |
| 2012   | 2236                    | 62 (2.77)                      | 4                                    | 57                                  | 5                                       |
| 2013   | 2322                    | 169 (7.27)                     | 38                                   | 168                                 | 1                                       |
| 2014   | 2366                    | 15 (0.63)                      | 2                                    | 13                                  | 2                                       |
| 2015   | 3007                    | 24 (0.79)                      | 9                                    | 23                                  | 1                                       |
| 2016*  | 1873                    | 29 (1.54)                      | 13                                   | 27                                  | 2                                       |
| Toplam | 11804                   | 299 (2.53)                     | 66                                   | 288                                 | 11                                      |

<sup>a</sup> Akciğer Örnekleri: ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide sıvısı, bronkoalveolar lavaj (BAL), bronş lavaj (BL) transtrakeal aspirasyon örnekleri

<sup>b</sup> Akciğer Dışı Örnekler: Akciğer örnekleri grubu dışı tüm örnekler

\* Ocak-Eylül 2016 (9 ay) verisidir.



Şekil 1. Tür tanımlaması yapılan TDM'lerin türlere ve yıllara göre dağılımı. (\*:Ocak-Eylül 2016 verisidir).

TDM izole edilen 288 akciğer örneğini 196 BL, 47 balgam ve 45 BAL örneği oluşturmaktadır. Laboratuvara gönderilen beş idrar, iki doku, iki lenf nodu, bir abse ve bir kemik iliği olmak üzere toplam 11 akciğer dışı örnekte TDM belirlenmiştir. Akciğer dışı örnekler grubunda tür tanımlaması yapılan beş örnek incelendiğinde, bir doku, bir lenf nodu ve bir kemik iliği örneğinde *M. abscessus*, bir idrar örneğinde *M. gordonae* ve bir lenf nodu örneğinde *M. fortuitum* izole edilmiştir.

Toplam çalışılan örnek sayısı ve TDM saptanan örnek sayılarının yıllar arasındaki değişimi incelendiğinde özellikle 2012-2013 ve 2015-2016 yılları arasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Bunların aksine 2013-2014 yılları arasında ise anlamlı bir azalma belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

TDM'lerin en sık izole edildiği 2013 yılında 130 BL, 34 BAL, dört balgam ve bir idrar örneğinde TDM üremesi olmuştur. Tür tanımlaması yapılan 38 TDM incelendiğinde, 29 BL ve altı BAL örneğinde *M. fortuitum*, bir balgam örneğinde *M. chelonae*, bir balgam örneğinde *M. abscessus* ve bir idrar örneğinde *M. gordonae* belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

Yıllar içerisinde bilinen TDM türlerinde hızlı bir artış görülmekte, bunun yanı sıra insanlarda patojen olarak tanımlanan tür sayısında da artış ortaya çıkmaktadır. Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda metodolojinin geliştirilmesi ile izolasyonun arttırılması ve klinik örneklerden TDM'lerin daha hızlı ve doğru olarak tanımlanması TDM'lerin insanlardaki patojenitesi ile ilgili farkındalığın artmasında önemli faktörlerdir<sup>(1)</sup>.

TDM'lere bağlı hastalıklar araştırıldığında insan immün yetmezlik virüsü (HIV) negatif kişilerde

en sık karşılaşılan klinik formun kronik akciğer hastalığı olduğu ve bu hastalardan en sık izole edilen etkenlerin de *Mycobacterium avium* kompleks (MAC), *M. kansasii* ve *M. abscessus* olduğu gözlenmektedir<sup>(2)</sup>.

Çalışmamızda, laboratuvarımıza dört yıllık süreçte tüberküloz şüphesi ile gönderilen ve TDM izole edilen örnekler incelenmiştir. Bu süreçte gönderilen 11.804 örnekten 299'unda TDM izole edilmiş ve TDM üreme oranı %2.53 olarak saptanmıştır. TDM izole edilen örnekleri örnek alım bölgelerine göre incelediğimizde büyük çoğunluğunun akciğer örnekleri grubuna (288/299) ait olduğu görülmektedir.

Laboratuvarımızda TDM olarak tanımlanan 299 izolattan klinik olarak da etken olabileceği düşünülen 66'sında tür düzeyinde tanımlamaya gidilmiş ve 41 örnekten izole edilen *M. fortuitum*'un (%62) en sık tür olduğu saptanmıştır. Bunu 11 örnek ile *M. abscessus* (%17), altı örnekle *M. chelonae* (%9), beş örnekle *M. gordonae* (%7.5), iki örnekle *M. intracellulare* (%3) ve bir örnekle *M. kansasii* (%1.5) izlemektedir. TDM'lerin türlere göre dağılımında özellikle hızlı üreyen mikobakterilerin ön planda olduğu dikkati çekmiştir.

Prevots ve ark.'nın<sup>(5)</sup> 2015 yılında yayınlanan derlemelerine göre popülasyon temelli veriler, 2000 yılından beri TDM prevalansında sürekli bir artış olduğunu ve Avrupa'da prevalansın Kuzey Amerika ve Avustralya'dan daha düşük olduğunu göstermektedir. MAC Kuzey Amerika ve Doğu Asya'da baskın iken *M. kansasii*, *Mycobacterium xenopi* ve *Mycobacterium malmoeense* Avrupa'da; MAC, *M. xenopi* ve *M. abscessus* Ortadoğu ve Güney Asya'da daha yaygındır. Çalışmamızda tanımlanan TDM'lerin dağılımı bu çalışma ile uyumlu bulunmamıştır.

Velayati ve ark.'nın<sup>(6)</sup> Ortadoğu'da TDM'lerin durumunu inceledikleri 2014 yılında yayımla-

nan derlemelerinde toplam 1.751 TDM suşunun izole edildiği 96 yayın incelenmiştir. Yapılan değerlendirmede *M. fortuitum* klinik (269/447 %60.1) ve çevresel (135/289 %46.7) örnekler arasında en sık izole edilen hızlı üreyen mikobakteri olarak belirlenmiştir. Bu veriler çalışmamızda tür tanımlaması yapılan TDM'ler arasında en sık *M. fortuitum* saptanması (%62) ile benzerlik göstermektedir. MAC (140/637 %21.9) ise yavaş üreyen mikobakteriler arasında klinik örneklerden en sık izole edilen tür olmuştur. Yayın son beş yılda Ortadoğuda giderek artan TDM izolasyonuna dikkatleri çekmektedir.

Albayrak ve ark.'nın<sup>(7)</sup> ülkemizde 2009-2010 yılları arasında TDM tür tayini amacıyla line-prob yöntemini kullanarak yaptığı çalışmada, TDM üremesi olan 75 suş arasında en sık *M. fortuitum* (%33.3) ikinci sıklıkta *M. abscessus* (%18.7) saptanmıştır. Türlerin dağılımı çalışmamızdaki bulgularla benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada, *M. fortuitum* izolatlarının çoğunun diğer laboratuvarlardan tür tayini amacıyla referans laboratuvara gönderilen izolatlar olduğu belirtilmiştir. Klinisyenler ile görüşülerek klinik anlamlılığı test edilen numunelerde ise *M. fortuitum*'un saptanma sıklığı istatistiksel olarak düşük ( $\chi^2=4.412$ ;  $p=0.036$ ) bulunmuştur.

Biçmen ve ark.'nın<sup>(8)</sup> 2004-2006 yılları arasında İzmir'de TDM tür tanımlaması için iki farklı ters hibridizasyon esaslı ticari kit kullanarak yaptıkları çalışmada, 9660 hastanın 30'unda TDM üremesi saptanmıştır. Tür dağılımı incelendiğinde çalışmamıza benzer şekilde *M. fortuitum-Mycobacterium peregrinum* kompleks (%16.7) en sık rastlanan tür olmuştur. Bu çalışmada, hastaların yinelenen kültürlerinden aynı tür TDM'nin tanımlanması ile beraber histopatolojik bulgular ve klinik verilerin de TDM enfeksiyonu tanısının konması açısından önem taşıdığı vurgulanmıştır.

Saeed ve ark.'nın<sup>(9)</sup> belirttiği gibi bronkoskop cihazı ile örnek alımı özellikle balgam çıkarmayan hastalarda tanı için önemli bir yol olsa da yalancı salgınlar ve salgınlar için önemli bir kaynak olduğu bilinmektedir. TDM salgınları için bronkoskopların dekontaminasyon işlemi sırasında yapılan hatalar, steril olmayan su kullanımı ve mikroorganizmaların biyofilm özelliği önemli nedenlerdir.

Çalışmamızda 2012-2013 yılları arasında TDM'lerde anlamlı bir artış ortaya çıkmış ( $p<0.05$ ), yapılan değerlendirmede 2013 yılında gözlenen bu artışın akciğer örneklerinden (BAL ve BL) kaynaklandığı ve bunun nedeninin bronkoskop cihazlarının kontaminasyonu, cihazların sterilizasyon yöntemlerindeki değişiklik/eksikliklere bağlı olabileceği düşünülmüş, ilgili üniteyle birlikte çalışılarak sorun çözülmüştür. Bronkoskop cihazlarının sterilizasyon yöntemleri düzenlendikten sonra 2013-2014 yılları arasında TDM'lerde anlamlı bir azalma belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Özçolpan ve ark.'nın<sup>(10)</sup> Manisa'da yaptığı çalışmada, 5.122 örneğin 126'sında (%2.46) TDM üremesi saptanmıştır. TDM üreme oranı çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada, 126 TDM suşundan 101'i DNA dizi analizi ile tanımlanmış, tür dağılımı; *Mycobacterium porcinum* (%39.60), *Mycobacterium lentiflavum* (%35.65), *M. abscessus* (%5.64), *M. peregrinum* (%4.95), *M. gordonae* (%3.96), *M. fortuitum* (%2.97), *M. chelonae* (%1.98), *Mycobacterium alvei* (%0.99), *Mycobacterium scrofulaceum* (%0.99) ve *M. kansasii* (%0.99) olarak bildirilmiştir.

Özçolpan ve ark.'nın<sup>(10)</sup> çalışmasında, 2010 yılında diğer yıllara oranla daha fazla TDM üremesi saptanmış ve bu dönemde izole edilen *M. porcinum* ve *M. lentiflavum* suşlarının tümü BAL örneklerinden üretilmiştir. 2010 yılında gözlenen TDM üremesindeki artış nedeniyle

Göğüs Hastalıkları Kliniği ile temasa geçilerek bronkoskopların ve yıkama cihazında kullanılan solüsyonların dezenfeksiyon yönünden değerlendirilmesi önerilmiş ve yıkama solüsyonlarından ve bronkoskop örneklerinden kontrol kültürleri istenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucu dezenfeksiyon yöntemi değiştirilmiştir. Özçolpan ve ark.'nın<sup>(10)</sup> çalışmasında, TDM üre-  
mesindeki artışın bronkoskopik örneklerin kontaminasyonuna bağlı gelişmiş olabileceği ve bu durumun çalışmamızda 2013 yılında ortaya çıkan duruma benzerlik göstermesi dikkat çekicidir.

Çalışmamızda, etken-kontaminasyon ayırımına yön vermek açısından TDM izole edilen hastalara ait klinik/radyolojik verilerin elimizde bulunmaması bir kısıtlılık oluşturmıştır.

Sonuç olarak, günümüzde önemi giderek artan TDM enfeksiyonlarını değerlendirmek açısından TDM izole edilen hastaların klinik ve radyolojik verilerini içeren daha kapsamlı çalışmaların yapılması bölgemiz ve ülkemizdeki epidemiyolojik durumun daha doğru ortaya konmasını sağlayacaktır.

### Teşekkür

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvar çalışanları Macide Oylum ve Feryal Uysal'a katkılarından dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

### KAYNAKLAR

1. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367-416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
2. Özkara Ş, Kılıçaslan Z, Bilgiç H, Karadağ M. Toraks Kitapları – Tüberküloz. İstanbul: Aves Yayıncılık/İstanbul; 2010; Sayı 11.
3. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res*. 2004;120(4):290-304.
4. Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clin Chest Med*. 2015;36(1):91-9. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.11.002>
5. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med*. 2015;36(1):13-34. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.002>
6. Velayati AA, Rahideh S, Nezhad ZD, Farnia P, Mirsaeidi M. Nontuberculous mycobacteria in Middle East: Current situation and future challenges. *Int J Mycobacteriol*. 2015;4(1):7-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.12.005>
7. Albayrak N, Simşek H, Sezen F, Arslantürk A, Tarhan G, Ceyhan I. Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında 2009-2010 yıllarında tesbit edilen tüberküloz dışı mikobakterilerin dağılımlarının irdelenmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(4):560-7.
8. Biçmen C, Coşkun M, Gündüz AT, Senol G, Cırak AK, Tibet G. Klinik örneklerden izole edilen atipik mikobakterilerin 'Line Probe Assay' (LIPA) yöntemiyle tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*. 2007;41(4):503-10.
9. Saeed DK, Shakoore S, Irfan S, Hasan R. Mycobacterial contamination of bronchoscopes: Challenges and possible solutions in low resource settings. *Int J Mycobacteriol*. 2016;5(4):408-411. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.08.002>
10. Özçolpan OO, Sürücüoğlu S, Özkütük N, Çavuşoğlu C. Klinik örneklerden soyutlanan ve DNA dizi analizi ile tanımlanan tüberküloz dışı mikobakterilerin dağılımı. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49(4):484-93. <https://doi.org/10.5578/mb.9698>



