

Cilt / Volume 49

Sayı / Number 3

Eylül / September 2019

ISSN 0258-2171  
e-ISSN 2458-7516



# Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

*Journal of Turkish Society of Microbiology*

- ✓ Mikobakteri Enfeksiyonu Şüpheli Hastaların Solunum Yolu Örneklerinin Direkt Mikroskopik İncelenmesinde Manuel (TB Fluorescent Stain Kit) ve Otomatize (RAL Stainer) Floresan Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması
- ✓ Nötropenik Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde Viral Etkenlerin Araştırılması
- ✓ Çevresel Etkenler ve Beslenmenin Otizme Etkisini Olası Kılan Mekanizma: Bağırsak Mikrobiyotası
- ✓ Mersin'de Tüberküloz Plörezili Otuz Sekiz Hastanın Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi
- ✓ *Geobacillus toebii* HBB-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Konserve Gıdalarda *Bacillus coagulans* ve *Geobacillus stearothermophilus*'u Engellemek Amacıyla Uygulanması

ISSN 0258-2171  
e-ISSN 2458-7516

---

# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

*JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY*

---



**Cilt / Volume 49**

**Sayı / Number 3**

**Eylül / September 2019**



# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

## JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 49 Sayı / Number 3 Eylül / September 2019

### 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-AI;** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

### Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

*Cihangir Akdemir, Giresun*

*Cengiz Çavuşoğlu, İzmir*

*Ayşe Kalkancı, Ankara*

*Cumhur Özkuyumcu, Ankara*

*Işın Akyar, İstanbul*

*Feriha Çilli, İzmir*

*Ülkü Karaman, Ordu*

*Mustafa Özyurt, İstanbul*

*Mustafa Altay Atalay, Kayseri*

*Melek Demir, Denizli*

*Onur Karatuna, İstanbul*

*Fatih Şahiner, Ankara*

*Oktay Alver, Bursa*

*Enes Dertli, Bayburt*

*Canan Külâh, Zonguldak*

*Ömer Şimşek, Denizli*

*Sibel Aydoğan, Ankara*

*Fahriye Eksi, Gaziantep*

*Gülâyl Korukluoğlu, Ankara*

*Fazıl Alper Tekeli, Ankara*

*Gülçin Bayramoğlu, Trabzon*

*Zayre Erturan, İstanbul*

*Mine Hoşgör Limoncu, İzmir*

*Ebru Us, Ankara*

*Yunus Emre Beyhan, Van*

*Işıl Fidan, Ankara*

*Bariş Otlu, Malatya*

*Yayımlanan sayıya ait değerlendirme sürecini kapsamaktadır.*

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

### Sahibi / Owner

**Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Adına**  
*On Behalf of The Turkish Society of Microbiology*

**Prof. Dr. Barış Otlu**

### 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.*

©Her hakkı saklıdır. Bu dergide yer alan yazı, makale, fotoğraf ve illüstrasyonların elektronik ortamlarda dahil olmak üzere kullanma ve çoğaltılma hakları Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği'ne aittir. Yazılı ön izin olmaksızın materyallerin tamamının ya da bir bölümünün çoğaltılması yasaktır. Dergi Basım Meslek İlkeleri'ne uymaktadır.

©All rights are reserved. Rights to the use and reproduction, including in the electronic media, of all communications, papers, photographs and illustrations appearing in this journal belong to Turkish Society of Microbiology. Reproduction without prior written permission of part or all of any material is forbidden. The journal complies with the Professional Principles of the Press.

**Yayın Türü:** Yerel Süreli

**Basım Yeri / Printed by**

LOGOS YAYINCILIK TİC. A.Ş.  
Yıldız Posta Cad. Sinan Apt. No. 36 D. 63/64  
34349 Gayrettepe-İstanbul



**Tel:** (0212) 288 05 41

**Faks:** (0212) 211 61 85

**mail:** logos@logos.com.tr

**web:** www.logosyayincilik.com

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



## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### DERLEME / REVIEW

- **Çevresel Etkenler ve Beslenmenin Otizme Etkisini Olası Kılan Mekanizma: Bağırsak Mikrobiyotası**  
*Gut Microbiota as the Mechanism Enabling the Effects of Environment and Diet on Autism*  
Ceymi DOENYAS ..... **113-117**

### ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS

- **Mikobakteri Enfeksiyonu Şüpheli Hastaların Solunum Yolu Örneklerinin Direkt Mikroskopik İncelenmesinde Manuel (TB Fluorescent Stain Kit) ve Otomatize (RAL Stainer) Floresan Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması**  
*Comparison of Manual (TB Fluorescent Stain Kit) and Automated (RAL Stainer) Fluorescent Staining Methods for Direct Microscopic Examination of Respiratory Tract Samples of Patients with Suspected Mycobacterial Infection*  
Cengiz ÇAVUŞOĞLU, Ayşe ARSLAN ..... **118-124**
- **Nötropenik Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde Viral Etkenlerin Araştırılması**  
*Investigation of Viral Agents in the Respiratory Tract Samples of Neutropenic Patients*  
Harun AĞCA, Halis AKALIN, Rıdvan ALİ, Ezgi DEMİRDÖĞEN ÇETİN, Burcu DALYAN CİLO, Esra KAZAK, Fahir ÖZKALEMKAŞ, Beyza ENER ..... **125-131**
- **Mersin’de Tüberküloz Plörezili Otuz Sekiz Hastanın Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi**  
*Retrospective Evaluation of 38 Patients with Tuberculous Pleurisy in Mersin*  
Mahmut ÜLGER, Nurbanu KURNAZ, Seda TEZCAN ÜLGER, Nuran DELİALİOĞLU, Gönül ASLAN ..... **132-139**
- **Geobacillus toebii HBB-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Konserve Gıdalarda Bacillus coagulans ve Geobacillus stearothermophilus’u Engellemek Amacıyla Uygulanması**  
*The Use of Bacteriocin Produced by Geobacillus toebii HBB 218 to Prevent the Growth of Bacillus coagulans and Geobacillus stearothermophilus in Canned Food*  
Ayşe ALKIŞ CEYLAN, Gamze BAŞBÜLBÜL ..... **140-146**

• <b>Çeşitli Postmortem Örneklerden İzole Edilen Maya Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları</b> <i>The Distribution of Species and Antifungal Susceptibilities of Yeasts Isolated from Various Postmortem Samples</i> Nihan ZİYADE, Neval ELGÖRMÜŞ, Murat Nihat ARSLAN .....	<b>147-153</b>
• <b>Gebelerde Sitomegalovirüs ile Rubella Seroprevalansının ve Yaşa Bağlı Dağılımının Araştırılması</b> <i>Investigation of Cytomegalovirus and Rubella Seroprevalence and Age Related Distribution in Pregnant Women</i> Yasemin Derya GÜLSEREN , Fatma ESENKAYA TAŞBENT, Mehmet ÖZDEMİR .....	<b>154-161</b>
• <b><i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Realtime PCR Yöntemi ile Saptanması İçin Metot Verifikasyon Çalışması</b> <i>Method Verification Study for Detection of Cryptosporidium spp. by Realtime PCR Method</i> Selma USLUCA, Asiye Evren EKEN BERBEROĞLU, Bekir ÇELEBİ, Selçuk KILIÇ .....	<b>162-168</b>
• <b>Vajinal Floradan İzole Edilen <i>Lactobacillus</i> sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması</b> <i>Investigation of Antibiofilm Activities of Lactobacillus sp. Metabolites Isolated from Vaginal Flora</i> Müjde ERYILMAZ, Didem KART, Suna Sibel GÜRPINAR .....	<b>169-174</b>
YAZARLARA BİLGİ .....	<b>V-VI</b>

# Çevresel Etkenler ve Beslenmenin Otizme Etkisini Olası Kılan Mekanizma: Bağırsak Mikrobiyotası

## *Gut Microbiota as the Mechanism Enabling the Effects of Environment and Diet on Autism*

Ceymi Doenyas <sup>®</sup>

Koç Üniversitesi, Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

### Öz

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), nedeni henüz bilinmeyen ve giderek yaygınlığı artan nörogelelişimsel bir farklılıktır. Bu makale, OSB'nin ortaya çıkmasında rolü olduğu öne sürülen çevresel etkenlerin hangi mekanizma üzerinden nörolojik bir rahatsızlığı etkileyebileceği konusunu ele almaktadır. Son yıllarda bağırsak mikrobiyotasına olan ilgi ve bu doğrultuda yapılan çalışmalar, bu bakterilerin çevresel faktörlerden nasıl etkilendiğini ve sinir sistemi üzerinde nasıl etkiler oluşturabildiğini göstermiştir. Çevresel etkenler ve beslenmenin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri de son yıllarda açığa çıkmaya başlamıştır. Makalede, bu çalışmalar derlenerek bulguları ve önemleri tartışılmış, son olarak ise bu bilgiler ışığında otizm için oluşturulabilecek yeni, bileşik tedaviler önerilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Otizm spektrum bozukluğu, bağırsak mikrobiyotası, çevre, beslenme

### ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental difference with rising prevalence and no known etiology. This article discusses the mechanism by which the environmental factors suggested to play a role in the emergence of ASD may influence a neurological disorder. The global interest in gut microbiota in the recent years produced research results that reveal how these bacteria are affected by environmental factors and how they can affect the nervous system. The effects of environmental factors and diet on gut microbiota have also begun to emerge in the recent years. In this article, these findings are overviewed and their significance is discussed. This discourse is concluded by proposing combined treatments that target the gut microbiota for individuals with ASD.

### Alındığı tarih:

07.01.2019

### Kabul tarihi:

14.05.2019

### Yayın tarihi:

30.09.2019

### ORCID Kayıtları

C. Doenyas 0000-0002-4809-8719

✉ ceymidoenyas@alumni.princeton.edu **Keywords:** Autism spectrum disorder, gut microbiota, environment, diet

## GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal beceri zorlukları ve yineleyen kısıtlı davranış ve ilgi alanları gösteren, yaklaşık üç yaşından itibaren tanısı konulabilen, nedeni henüz bilinmeyen nörogelelişimsel bir farklılıktır<sup>(1)</sup>. Otizme neden olan bir ya da birden fazla genin henüz bulunamamış olması ve otizmin yaygınlığının genetik değişikliklerle açıklanamayacak bir hızda artması otizmde çevresel etkilerin önemini ön olana çıkarmış, genetik yatkınlığı olan bireylerde hamilelik sırasında maruz kalınan çevresel etkenlerin

otizmin oluşmasında neden veya pay sahibi olabileceği öne sürülmüştür<sup>(2)</sup>. Ancak çevresel etkilerin önemi ile ilgili kanıtlar, genetik kanıtların önüne geçememiştir. Bu nedenle çevresel etkileri genetik yatkınlığı olan bireylerde otizm için tetikleyici veya otizm şiddetini belirleyici bir unsur olarak düşünmek daha doğru olacaktır.

Yirmi yılı aşkın bir süredir otizmde kurşun, cıva, pestisit, ev temizlik ürünlerindeki kimyasallar gibi maddelerin nörotoksik bir etkisinin olabileceği<sup>(3)</sup> ve gelişmekte olan beyin bu tür toksik maddelerin hedefi

olduğu<sup>(4)</sup> fikirlerini savunanlar bulunmaktadır. Bu yıl yayımlanan kapsamlı bir derlemede, otizmle şu ana kadar ilişkilendirilmiş çevresel etkenlerden bazıları hava kirliliği, pestisitler, çözücüler kayganlaştırıcılar ve ilaçlar ile gıda takviyelerinde kullanılan fitalat ve endüstriyel poliklorin bifenil kimyasalları, gebelikte alınan ilaçlar ve sigara kullanımı ile gebelikte beslenme gibi yaşam tarzı etkenleri sıralanmıştır<sup>(5)</sup>. Fakat bu çevresel etkenlerin kendi başlarına otizm etiolojisinde bir rol oynayıp oynamadığı kanıtlanmamıştır. Valproik asit, propiyonik asit ve gebe annenin inflamasyon veya bağışıklık sistemi aktivasyonu geçirmesi gibi etkenlerin farelerde otizm benzeri davranışlara yol açtığı bulunmuş olsa da bunların tek başına insanlarda otizm nedeni olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği konusunda bir çalışma veya kesin bir bulgu bulunmamaktadır.

Gebelikte beslenmenin yanı sıra 1990'lerden beri çocuklarda glütensiz ve kazeinsiz beslenmenin otizm davranışlarında iyileşmeye yol açtığı konusunda ebeveyn raporları ile bilimsel makaleler bulunmaktadır<sup>(6-8)</sup>. Hatta 2000 yılında bir araştırma grubu, otizm ve şizofreniyi "bağırsak rahatsızlıkları" olarak isimlendirmiştir<sup>(9)</sup>. Fakat bir spektrum bozukluğu olan otizmin bireyden bireye farklı özellikler taşıması da göz önünde bulundurularak, bu konudaki bilimsel araştırmalar üzerinde yapılan sistematik incelemeler bu tür beslenmelerin etkili olup olmadığı konusunda kesin bir sonuç belirtmekten kaçınmıştır.

Bu derlemede, son birkaç yılda otizmde önemli bir araştırma konusu hâline gelen bağırsak mikrobiyotasının, yıllardır gündemde yer alan fakat tamamen desteklenmemiş iki unsur olan çevresel risk faktörleri ve beslenmenin OSB üzerinde etkili olabilecek bir mekanizma sunabileceği hipotezleri incelenmektedir.

#### **Bağırsak mikrobiyotası ve çevresel etkenler**

Bağırsak mikrobiyotasının genler ile çevresel etkenlerin kesişimi arasında yer aldığı, çünkü bu floranın bileşiminin ve işlevinin hem genetik unsurlara bağlı olduğu hem de önemli bir derecede çevresel etkenler tarafından şekillendiği yakın bir zamanda belirtil-

miş, bu çevresel faktörlere örnek olarak ise yaş, geçirilen hastalıklar, vücutta üretilmemiş yabancı maddeler ile beslenme verilmiştir<sup>(10)</sup>. Böylece bağırsak mikrobiyotası, uzun zamandır otizm ile ilişkisi olduğu düşünülen çevresel etkenlerin nasıl otizm belirtilerine yol açabileceği konusunda bir mekanizma olma özelliği taşımaktadır.

Bağırsak mikrobiyotasının içeriği patojenlerden ve beslenmeden etkilenmekte ve bu mikrobiyotadaki bakteriler ürettikleri kısa zincirli yağ asitleri ve sinir sistemine etki eden metabolitler ile beyine etki edebilmekte, böylece beynin işlevini ve bireyin davranışlarını etkileyebilmektedirler<sup>(11)</sup>. Bu özellikleri göz önüne alındığında, vücuda gelen zararlı maddeler ve beslenme ile alınan gıdaların otizm belirtilerinin ortaya çıkmasında veya artış azalmasında oluşturabilecekleri etkilerin, bağırsak mikrobiyotası üzerine yaptıkları etkiler üzerinden şekillenmesi olasıdır.

Bağırsak mikrobiyotası, otizmdeki yaygınlığın çevresel etkenler ile paralel olarak nasıl artış gösterdiğini anlatmak için bir mekanizma olarak on yıl kadar önce önerilmiştir. Bu teori, otizmlili bireylerin bağırsaklarında daha fazla bulunan *Clostridium* bakterisinin sporlarının antimikrobiyal etkilere ve yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı dayanıklı olmalarından ötürü, *Clostridium* sporlarının otizmin yaygınlığındaki açıklanamayan artış ile ilgili olabileceğini öne sürmektedir<sup>(12)</sup>. Bu teoride söz edilen otizmde daha fazla olduğu bulunan *Clostridium* grupları, *Clostridium bolteae*, *Clostridial cluster I* ve *XI* olmakta, bağırsak homeostazını düzenlediği bilinen cluster XVIa türünün ise otizm ve kontrol grubu arasında farklılaşmadığı belirtilmektedir. Bu teori ile aynı doğrultuda, 2018 yılında yayımlanan bir çalışmada, glifosat (GLY) adı verilen zararlı otları öldürmek için kullanılan maddenin insan bağırsağındaki bazı bakteri türlerini (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus* spp.) öldürürken bu zararlı maddeye karşı dayanıklı olan *Clostridium* (*Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*) bakterisine bir etkisi olmamasından yola çıkarak, bu konudaki araştırmalar taranmış ve

bağırsaktaki *Clostridium* bakteri seviyesi ile otizm belirtileri arasında bir ilişki bulunmuştur<sup>(13)</sup>. Bu makalede, otizmlilerde kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu belirtilen *Clostridium* grupları, toksin üreten *Clostridium histolyticum* (cluster I ve II) ve *Clostridium perfringens* grupları ile bağırsak çeperinde bozulmalar olduğu durumlarda enfeksiyonlara yol açabilen *Clostridium bolteae*'dir. Otizmlilerde bağırsak çeperlerinin daha geçirgen olduğuna dair bulgular bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında, çevresel GLY seviyelerinin toksin üreten veya bağırsak sağlığına zarar veren *Clostridium* bakterilerinin büyümesine destek olarak otizme yatkınlığı olan bireylerde bağırsak-beyin eksenini olumsuz etkileyebileceği öne sürülmüştür<sup>(13)</sup>. Böylece çevresel kimyasallar, bağırsak mikrobiyotasındaki diğer türleri öldürerek rekabeti azaltıp bu toksin üreten ve otizm belirtileri ile ilişkili olan bakteri türünün çoğalmasına ve dolayısıyla otizm belirtilerinin ağırlaşmasına yol açıyor olabilir. Bu konuda dikkat edilmesi gereken nokta, yazarların otizmlilerde daha fazla sayıda olduğunu buldukları toksin üreten *Clostridium* türleri üzerinden genelleme yaparak ve *Clostridium*'un bilinen özelliklerini kullanarak otizme açıklama getirmeye çalışmasıdır. Bu teoriler ve bulgular bütün *Clostridium* türlerinin otizmde farklılaştığı veya hepsinin zararlı olduğu anlamını taşımasa da bilinmesi gerekir ki otizmde fark gösteren *Clostridium* türleri genelde bağırsak sağlığını koruyan türler değil, aksine toksin üreten türlerdir.

### Beslenme ve bağırsak mikrobiyotası

Çevresel kimyasallara benzer bir şekilde, beslenme ve diğer çevresel etkenlerin de genetik yatkınlığı olan bireylerde tetikleyici unsur olabileceği, böylece en azından bazı bireylerde otizmin ortaya çıkmasına yol açabileceği önerilmiştir<sup>(14)</sup>. Bu tür önermeler, son yıllarda beslenmenin bağırsak mikrobiyotasında yaptığı değişikliklerin bilimsel olarak kanıtlanması ile destek bulmuş, özellikle yenilen yemeklerin bağırsaktaki bakteri gruplarının yapısını ve genlerinin ekspresyonunu etkilediği ortaya konulmuştur<sup>(15)</sup>. Otizmde bazı kesimler tarafınca etkinliğine inanılan ve kullanılan glutensiz beslenmenin sağlıklı bireylerin bağırsakla-

rındaki *Clostridium* oranlarını azalttığı fakat aynı zamanda insan sağlığına yararlı olan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* bakterilerinin azalmasına da yol açtığı bulunmuştur<sup>(16)</sup>. Bu glutensiz beslenmenin *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* bakterilerinde azalmaya yol açarken, sindirim sisteminde hastalıklara neden olan ve fırsatçı patojen olarak nitelendirilen *Escherichia coli* ve *Enterobacteriaceae* bakterilerinde bir artışa yol açtığı da ortaya konulmuştur<sup>(16,17)</sup>.

Otizimde kullanılan diğer bir beslenme türü olan ketojenik beslenmenin fare modellerinde otizmin ana belirtilerinde iyileşmelere yol açtığı gösterilmiştir<sup>(18)</sup> fakat yine fare modelinde yapılan bir çalışmada, bu beslenmenin otizmde görülen bazı bağırsak bakteri oranlarındaki değişiklikleri düzeltmesine rağmen, toplam bağırsak bakteri sayısını azalttığı bulunmuştur<sup>(19)</sup>.

Otizmlilerde yapılan çalışmada ise hem glutensiz-kazeinsiz beslenmenin hem de ketojenik beslenmenin, bu tür özel beslenme uygulamayan otizmlilere kıyasla, otizm belirtilerinde anlamlı iyileşmelere yol açtığı bulunmuştur<sup>(20)</sup>. Benzer bir şekilde bir olgu sunumunda, glutensiz-kazeinsiz beslenmenin otizm belirtilerinde belirgin iyileşmelere yol açtığı, sonradan bu beslenmeye devam edilecek şekilde ketojenik unsurların da eklenmesi ile epilepsi nöbetlerinde de belirgin iyileşmeler olduğu gözlemlenmiştir<sup>(21)</sup>. Ketojenik beslenmenin otizmlilerde etkilerini inceleyen sistematik bir derleme, otizm belirtilerini ve otizmle birlikte görülen rahatsızlıklardan biri olan epilepsi nöbetlerini kontrol altına almayı, gözlemlenen sonuçlar olarak belirtmiştir. Otizm tedavisi konusunda yapılan ilaç araştırmaları günümüzde hâlâ kesin bir sonuca ulaşmamış ve devam etmektedir. Bir spektrum bozukluğu olan otizmde farklı davranış ve tıbbi durumlar ile seyreden farklı alt gruplar bulunmaktadır. Bu nedenlerden ötürü ketojenik beslenmenin henüz iyileştirici bir ilacı bulunmayan ve farklı tedavilere yanıt veren alt gruplar içeren otizmde bir araştırma hedefi olarak incelenebileceği önerilmiştir<sup>(22)</sup>.

### Bileşik tedavi olasılıkları

Otizm ve diğer nörolojik, öğrenme, psikolojik, bağışıklık ve mide rahatsızlıkları belirtilerinin beslenme tarzı ile iyileştirilebileceğini öne süren Campbell-McBride<sup>(23)</sup>, 2004 yılında “Bağırsak ve Psikoloji Sendromu Tedavisi” adı verdiği bir tedavi tanımlamıştır. Bireyleri vücutlarındaki toksik maddelerden arındırarak beyinlerinin düzgün bir biçimde gelişip çalışmasını sağlamak için bağırsağı temizleyecek bir beslenme programı geliştirmiştir<sup>(23)</sup>. Bu tedavinin dünya çapında yaygın şekilde kullanılması ve glutensiz-kazeinsiz beslenmenin hâlâ kullanılan ve yararlı görülen bir beslenme olması, bu tür beslenmeye dayalı müdahalelerin otizm tedavisinde göz ardı edilmemesi gerektiğine işaret etmektedir.

Fakat yeni bulgular ışığında bu tür beslenmelerin insan sağlığına yararlı bakterileri azalttığı ve hastalıklara yol açan bakterileri arttığı bulunması, bu tür beslenme tedavilerinin güncellenmesi ve geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

2018 yılında yayımlanan bir çalışmada, glutensiz ve kazeinsiz beslenmeye ek olarak ilk defa prebiyotik takviye kullanılmış, bu tür bir takviyenin hem davranışlarda düzelmelere yol açtığı hem de bağırsak bakteri bileşimi ve ürettikleri metabolitler üzerinde anlamlı değişiklikler oluşturduğu bulunmuştur<sup>(24)</sup>. Bu çalışmanın sonucunda, glutensiz-kazeinsiz beslenme ile prebiyotik takviyesinin bir arada kullanılması gibi bileşik tedavilerin hem bağırsak sağlığı hem davranışlar açısından tek bir beslenme uygulamasına kıyasla daha yararlı sonuçları olabileceği önerilmiştir<sup>(24)</sup>.

Ayrıca, *Clostridium* bakterilerinin *Clostridium difficile* ve otizmde daha yoğun görülen *Clostridium perfringens* gibi bazı türleri şu ana kadar kullanılan antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir<sup>(25,26)</sup>. 2016 yılında yayımlanan bir makalede, yeni bir toprak bakterisinden elde edilen “teiksobaktin” isimli yeni bir antibiyotik gündeme getirilmiştir ve bu doğal antibiyotiğin gram-pozitif bakterilerde hücre duvarı sentezini engelleyerek bakterisidal etki gösterdiği belirtilmektedir<sup>(27)</sup>. Bu yeni keşfedilen ve Gram-pozitif

bakteriler üzerinde etkinliği gösterilmiş teiksobaktin’in, otizmde bağırsak mikrobiyotasını bu bireylerde sayıca daha fazla olduğu gösterilen *Clostridium*’lardan temizlemek için bir tedavi olanağı sunup sunamayacağı ileriki çalışmalarda incelenebilir. Böyle bir tedavi gerçekleştirilirse, teiksobaktin antibiyotiğinin yok edebileceği bağırsak ve insan sağlığına faydalı (Örneğin, *Clostridium cluster* XIVa ve IV gibi bağırsak homeostazını düzenlediği bilinen bakteriler vb.) Gram-pozitif bakterilerin belirlenmesi önem taşır. Bu şekilde, bu bakteriler prebiyotik takviyesi olarak tedaviye eklenerek bağırsak mikrobiyotasındaki insan vücuduna sindirim konusunda ve ürettikleri kısa zincirli yağ asitleri ile yarar sağlayan bakterilerin zarar görmemesi sağlanabilir.

Bu bilgiler doğrultusunda, prebiyotik takviyesi ve doğal antibiyotik içeren bileşik bir glutensiz-kazeinsiz beslenme programı ile yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, otizmde çevresel etkenlerin ve beslenmenin rol oynadığı uzun zamandır önerilmiştir. Fakat son yıllarda bağırsak mikrobiyotasına olan ilgi ve araştırmalar sonucunda bu tür çevresel etkenlerin nasıl beyine ve davranışlara etki edebileceği konusunda biyolojik bir mekanizma ortaya çıkmıştır. Beslenme ile ilgili önerilen tedavilerin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin bilimsel gelişmeler sayesinde kapsamlı bir şekilde anlaşılması, onların olası zararlı etkilerini en aza indirip yararlarını arttırabilecek bileşik tedaviler bulma olasılığını sunmakta, böylece önümüzdeki yıllarda otizm tedavisinde önemli gelişmeler yaşanabileceğini düşündürmektedir.

### KAYNAKLAR

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub; 2013. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
2. London EA. The environment as an etiologic factor in autism: A new direction for research. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl 3):401-4. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3401>
3. May M. Disturbing behavior: Neurotoxic effects in

- children. *Environ Health Perspect.* 2000;108(6): A262-7.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.108-a262>
4. Rodier PM. Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect.* 1995;103(Suppl 6):S73-6.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.95103s673>
  5. Hertz-Picciotto I, Schmidt RJ, Krakowiak P. Understanding environmental contributions to autism: Causal concepts and the state of science. *Autism Res.* 2018;11(4):554-86.  
<https://doi.org/10.1002/aur.1938>
  6. Reichelt KL, Ekrem J, Scott H. Gluten, milk proteins and autism: dietary intervention effects on behavior and peptide secretion. *J Appl Nutr.* 1990;42:CD003498.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD003498.pub2>
  7. Whiteley P, Rodgers J, Savery D, Shattock P. A gluten-free diet as an intervention for autism and associated spectrum disorders: preliminary findings. *Autism.* 1999;3(1):45-65.  
<https://doi.org/10.1177/1362361399003001005>
  8. Bolte ER. Autism and *Clostridium tetani*. *Med Hypotheses.* 1998;51(2):133-44.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(98\)90107-4](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(98)90107-4)
  9. Cade R, Privette M, Fregly M, et al. Autism and schizophrenia: intestinal disorders. *Nutr Neurosci.* 2000;3(1):57-72.  
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2000.11747303>
  10. Vuong HE, Hsiao EY. Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry.* 2017;81(5):411-23.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.024>
  11. Yang Y, Tian J, Yang B. Targeting gut microbiome: a novel and potential therapy for autism. *Life Sci.* 2018;194:111-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.02>
  12. Finegold SM. Therapy and epidemiology of autism–clostridial spores as key elements. *Med Hypotheses.* 2008;70(3):508-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.07.019>
  13. Argou-Cardozo I, Zeidán-Chuliá F. *Clostridium* bacteria and autism spectrum conditions: A systematic review and hypothetical contribution of environmental glyphosate levels. *Med Sci.* 2018;6(2):pii:E29.  
<https://doi.org/10.3390/medsci6020029>
  14. van De Sande MM, van Buul VJ, Brouns FJ. Autism and nutrition: the role of the gut-brain axis. *Nutr Res Rev.* 2014;27(2):199-214.  
<https://doi.org/10.1017/S0954422414000110>
  15. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014;505(7484):559-63.  
<https://doi.org/10.1038/nature12820>
  16. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr.* 2009;102(8):1154-60.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114509371767>
  17. Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes.* 2010;1(3):135-7.  
<https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.11868>
  18. Ruskin DN, Svedova J, Cote JL, et al. Ketogenic diet improves core symptoms of autism in BTBR mice. *PLoS One.* 2013;8(6):e65021.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065021>
  19. Newell C, Bomhof MR, Reimer RA, Hittel DS, Rho JM, Shearer J. Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2016;7(1):37.  
<https://doi.org/10.1186/s13229-016-0099-3>
  20. El-Rashidy O, El-Baz F, El-Gendy Y, Khalaf R, Reda D, Saad K. Ketogenic diet versus gluten free casein free diet in autistic children: a case-control study. *Metab Brain Dis.* 2017;32(6):1935-41.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-017-0088-z>
  21. Herbert MR, Buckley JA. Autism and dietary therapy: Case report and review of the literature. *J Child Neurol.* 2013;28(8):975-82.  
<https://doi.org/10.1177/0883073813488668>
  22. Castro K, Faccioli LS, Baronio D, Gottfried C, Perry IS, dos Santos Riesgo R. Effect of a ketogenic diet on autism spectrum disorder: a systematic review. *Res Autism Spectr Disord.* 2015;20:31-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.rasd.2015.08.005>
  23. Campbell-McBride N. Gut and psychology syndrome. *J Ortomol Med.* 2008;23(2):13-23.
  24. Grimaldi R, Gibson GR, Vulevic J, et al. A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome.* 2018;6(1):133.  
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0523-3>
  25. Freeman J, Vernon J, Pilling J, et al. The ClosER study: results from a three-year pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, 2011-2014. *Clin Microbiol Infect.* 2014;24(7):724-31.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017>
  26. Rood JI, Maher EA, Somers EB, Campos E, Duncan CL. Isolation and characterization of multiply antibiotic-resistant *Clostridium perfringens* strains from porcine feces. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;13(5):871-80.  
<https://doi.org/10.1128/aac.13.5.871>
  27. Aktaş G. Yeni bir doğal antibiyotik: “Teikosbaktin”. *İst Tıp Fak Derg.* 2016;79(4):163-8.  
<https://doi.org/10.18017/itfd.01560>

# Mikobakteri Enfeksiyonu Şüpheli Hastaların Solunum Yolu Örneklerinin Direkt Mikroskopik İncelenmesinde Manuel (TB Fluorescent Stain Kit) ve Otomatize (RAL Stainer) Floresan Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması<sup>†</sup>

## Comparison of Manual (TB Fluorescent Stain Kit) and Automated (RAL Stainer) Fluorescent Staining Methods for Direct Microscopic Examination of Respiratory Tract Samples of Patients with Suspected Mycobacterial Infection

Cengiz Çavuşoğlu\*<sup>Ⓜ</sup>, Ayşe Arslan\*\*<sup>Ⓜ</sup>

\*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

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

### Öz

**Amaç:** Tüberküloz yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması nedeniyle hızlı tanı ve tedavi gerektiren bir hastalıktır. Mycobacterium tuberculosis tanısında mikroskopik inceleme önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, otomatize bir mikobakteri boyama sisteminin iki farklı protokolünün manuel floresan boyama yöntemi ile performans ve boyamanın kalitesi yönünden karşılaştırılması ve otomatize boyama sisteminin çapraz kontaminasyon olmadan kullanılabileceğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Yapılan çalışmada, bir üniversite hastanesi laboratuvarına rutin inceleme için gönderilen asidorezistan boyama (ARB) pozitif 100 solunum örneği değerlendirildi. Klinik örnekler dekontamine edildikten sonra her klinik örnekten toplam üç adet yayma hazırlandı. Yaymalardan birincisi manuel floresan boyama ile ikincisi otomatize boyama sisteminin konvansiyonel protokolüne göre ve üçüncüsü de kısa protokole göre boyandı. Yaymalar floresan mikroskopta artefaktın varlığı, renklerin parlaklığı ve değerlendirmenin kolaylığı açısından değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmada değerlendirilen tüm pozitif kontroller pozitif, tüm negatif kontroller ise negatif olarak saptandı ve otomatize boyama sisteminde hiçbir örnekte çapraz kontaminasyon saptanmadı. Manuel floresan boyama sistemi ile elde edilen sonuçlar ile otomatize boyama sisteminin konvansiyonel ve kısa protokolleri ile yapılan boyama sonuçları arasında sırasıyla yayma değerlendirmesinde %84 ve %82, artefakt varlığında %92 ve %85, renklerin parlaklığında %86 ve %89, değerlendirilmesinin kolaylığında ise %91 ve %89 uyum saptandı. Otomatize sistemin konvansiyonel ve kısa protokolleri ile manuel sistem arasındaki Cohen'in kappası katsayısı sırasıyla 0.79 ve 0.76 idi ve uyum kusursuz olarak değerlendirildi.

**Sonuç:** Otomatize boyama sisteminin kapalı bir sistem olduğu için laboratuvardaki kimyasal kontaminasyonu azaltacağı ve günlük uygulamalarda orta veya yüksek sayıda boyama yapılan özelleşmiş laboratuvarlarda iş yükünü azaltmak ve boyama standardizasyonunu arttırmak için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Floresan boyama, mikroskopi, tüberküloz

### ABSTRACT

**Objective:** Tuberculosis has high morbidity and mortality, so it requires rapid diagnosis and treatment. Microscopic examination has an important place in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infections. The aim of this study is to compare two different protocols of an automated mycobacteria staining system with the manual staining method in terms of performance and quality, and to show that automated system can be used without cross-contamination.

**Method:** In this study, acidoresistance staining positive (ARS+) 100 pulmonary specimens which were sent to a university hospital laboratory for routine analysis were examined. Clinical samples were decontaminated, then a total of three smears were prepared from these samples. These smears were stained according to manual fluorescence staining protocol, conventional automated staining protocol and short protocol respectively. Smears were examined in terms of the presence of artefacts, the color brightness and the ease of evaluation.

**Results:** Positive controls evaluated in the study were positive, and negative controls were negative, any cross-contamination was not detected in any sample in the automated staining system. The agreement between the results obtained in the manual staining protocol and the automated staining system (conventional and short protocol) was 84% and 82% for smear grade, 92% and 85% for presence of artefacts, 86% and 89% for brightness of the color, 91% and 89% for the ease of evaluation, respectively. The Cohen's kappa coefficients between the manual protocol, the automated conventional and short protocols were 0.79 and 0.76 that are considered as indicative of excellent agreement, respectively.

**Conclusion:** The automated staining system can be used because it decreases the chemical contamination, reduces workload in specialized laboratories which perform medium to high numbers of staining in their daily practice and improves standardization of staining methods.

**Keywords:** Fluorescent dyes, microscopy, tuberculosis

### Alındığı tarih:

04.12.2018

### Kabul tarihi:

21.05.2019

### Yayın tarihi:

30.09.2019

### ORCID Kayıtları

C. Çavuşoğlu 0000-0002-8525-7272

A. Arslan 0000-0002-4934-4889

✉ aysa\_demir@hotmail.com

<sup>†</sup> Bu makale 24. ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 10-13 Mayıs 2014, Barselona, İspanya) ve XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (12-16 Kasım 2014, Belek-Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

## GİRİŞ

*Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu akciğer ve akciğer dışı tüberküloz dünyada en çok ölüme yol açan enfeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya genelinde 2017'de yaklaşık 10 milyon yeni tüberküloz olgusunun olduğu ve yaklaşık 1.3 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle yaşamını kaybettiği bildirilmiştir<sup>(1)</sup>. Tüberküloz tanısında dünya genelinde en fazla kullanılan yöntem balgam örneğinden hazırlanan yaymanın mikroskopik incelenmesidir. Birçok laboratuvar da mikroskopik tanı amacıyla yaygın olarak Ziehl-Neelsen ile boyanmış preparatların konvansiyonel ışık mikroskopuyla incelenmesi kullanılmaktadır. Bu yöntemin duyarlılığı tüberküloz prevalansının yüksek olduğu bölgelerde yüksek olmasına karşın, büyük değişkenlikler (%20-%80) gösterebilmektedir ve HIV ile enfekte hastalarda geçerliliği oldukça düşüktür<sup>(2)</sup>. Diğer bir mikroskopik inceleme yöntemi olan floresan mikroskopisinin Ziehl-Neelsen mikroskopisine göre %10 daha duyarlı olduğu ve değerlendirme süresinin %25 daha kısa olduğu bildirilmektedir<sup>(3)</sup>. İleri inceleme yöntemlerinin olmadığı merkezlerde kültür sonucunu beklemek tedaviyi geciktireceği için direkt mikroskopik inceleme önemli bir yer tutmaktadır. Tedavi almayan tüberküloz hastalarında mortalitenin yüksek olduğu, doğal seyrindeki yayma pozitif tedavisiz akciğer tüberkülozu olgularının 10 yıl içinde %70'inin yaşamını kaybettiği bildirilmiştir<sup>(4)</sup>. Bu nedenle direkt mikroskopik incelemenin görüntü kalitesinin artırılması, daha kısa sürede sonuçlanması için yeni boyama seçeneklerine gereksinim vardır.

Otomatize RAL [Fluo-RAL (bioMérieux-Fransa)] boyama sistemi 20 adede kadar lamın aynı anda boyanabildiği tamamen kapalı bir sistemdir. Manuel boyamadan farklı olarak Auramine-Rhodamine yerine Auramine-Thiazine Kırmızısı boya kullanılır. Konvansiyonel ve kısa protokoller fiksatif solüsyon ve boya solüsyonlarında muamele süreleri açısından farklılık gösterir. Laboratuvarın gereksinimi ve isteği doğrultusunda dokuz adede kadar farklı protokol oluşturulabilir<sup>(5)</sup>.

Bu çalışmada, otomatize bir mikobakteri boyama sistemi olan RAL boyama sisteminin konvansiyonel ve kısa protokolünün manuel floresan boyama yöntemi ile performans ve boyamanın kalitesi yönünden karşılaştırılması ve RAL sisteminin çapraz kontaminasyon olmadan kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Klinik örnekler:** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na rutin inceleme için gönderilen örneklerden ARB pozitif olanlar seçildi, daha sonra çalışılması için örneklerden bir miktar ayrıldı. ARB pozitif olduğu bilinen 100 solunum örneği [80 balgam ve 20 balgam dışı solunum örneği (bronkoalveolar lavaj, bronkoskopik aspirasyon, postbronkoskopik balgam ve derin trakeal aspirat)] çalışmaya dâhil edildi. Çapraz kontaminasyonu değerlendirmek için her çalışmada pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Bu kontroller arşivimizdeki kültür sonuçlarına göre; 10 yayma-kültür negatif ve 10 yayma-kültür pozitif örnek olarak seçildi. Her boyamada bir pozitif kontrol ve bir de negatif kontrol preparat hazırlandı.

**Boyama yöntemi:** Klinik örnekler N-Acetyl-L-Cysteine – NaOH yöntemiyle dekontamine edildikten sonra her klinik örnekten lam üzerinde 2 cm<sup>2</sup> alanı dolduracak şekilde toplam üç adet yayma hazırlandı. Yaymalardan birincisi manuel floresan boyama (BD TB Fluorescent Stain Kit T) ile ikincisi RAL sisteminde konvansiyonel protokole göre ve üçüncüsü de RAL sisteminde kısa protokole göre boyandı. Karşılaştırma için EZN boyama yapılmadı. Her çalışmada, bir pozitif (H37Rv) ve bir negatif yayma kontrolü kullanıldı<sup>(6)</sup>.

**Manuel floresan boyama:** BD TB floresan boyama kiti T, üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Özetlenecek olursa; (i) Lamlar boyama askısına kondu ve lamların üstünü örtecek kadar TB Auramine-Rhodamine T boyası döküldü, oda sıcaklığında 25 dakika bekletildi ve distile su ile iyice yıkandı. (ii)

Lamlar TB decolorizer TM ile 2-3 dakika renksizleştirildi ve distile su ile iyice yıkandı. (iii) Lamlar zıt boyama için TB potasyum permanganat ile 4-5 dakika muamele edildi, distile su ile iyice yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı.

**RAL stainer konvansiyonel protokol:** Otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolü toplam 28 dakika sürdü ve aşağıdaki aşamalardan oluştu: (i) fiksatif solüsyonla 5 dakika muamele, ardından 10 saniye yıkama, (ii) auramine ile 15 dakika muamele ve 1 dakika yıkama, (iii) 1 dakika dekolorizasyon, ardından 10 saniye yıkama, (iv) thiazine kırmızısı ile 5 dakika muamele ve ardından 30 saniye yıkama.

**RAL stainer kısa protokol:** Otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolü toplam 19 dakika sürdü ve aşağıdaki aşamalardan oluştu: (i) fiksatif solüsyonla 3 dakika muamele, ardından 30 saniye yıkama, (ii) auramine ile 10 dakika muamele ve 30 saniye yıkama, (iii) 2.5 dakika dekolorizasyon, ardından 30 saniye yıkama, (iv) thiazine kırmızısı ile 1 dakika muamele ve ardından 30 saniye yıkama. RAL stainer boyama sistemi ile tek seferde toplamda 20 preparat boyanabildi.

**Yaymaların değerlendirilmesi:** Yaymalar floresan mikroskopunda 450 büyütmede Kent/Kubica kriterlerine göre kör olarak değerlendirildi<sup>(6)</sup>. Her yayma artefaktın varlığı, renklerin parlaklığı ve değerlendirmenin kolaylığı açısından değerlendirildi.

**Yöntem analizi:** İstatiksel analiz yöntemi olarak Cohen'nin Kappa katsayısı SPSS 18.0 programı ile hesaplandı. Cohen'in Kappa değerinin değerlendirilmesinde Landis ve Koch'un tablosu kullanıldı (Tablo 1)<sup>(7)</sup>. Yöntem karşılaştırılması Cohen's Kappa metodu kullanılarak, pozitif örneklerin karşılaştırılması ve anlamlı fark yorumu da %95 güven aralığı [confidence interval (CI)] kullanılarak yapıldı<sup>(8)</sup>. Ayrıca p değeri hesaplanmadı.

**Tablo 1. Kappa katsayısı değerlendirme tablosu.**

Katsayı	Yorum
< 0	Hiç uyuşma olmaması
0.0-0.20	Önemsiz uyuşma olması
0.21-0.40	Orta derecede uyuşma olması
0.41-0.60	Ekseriyetle uyuşma olması
0.61-0.80	Önemli derecede uyuşma olması
0.81-1.00	Neredeyse kusursuz uyuşma olması

## BULGULAR

Manuel floresan boyama sisteminin sonuçları ile otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolünün sonuçları karşılaştırıldığında yayma pozitifliğinin derecelendirmesinde %84 (CI 0.7547-0.9001) uyum saptandı. Kappa katsayısı 0.79 idi ve her iki yöntem arasında önemli derecede uyuşma olduğu görüldü. Manuel floresan boyama sisteminin sonuçları ile otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolünün sonuçları arasında artefakt varlığı açısından uyum %92 idi. Manuel floresan boyama yöntemiyle boyanan yaymaların üçünde ve otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolünü kullanılarak yapılan yaymaların ise sekizinde artefakt saptandı. Manuel floresan boyama sistemi ile boyanan yaymaların 85'inde ve otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolü ile boyanan yaymaların 97'sinde renk parlaklığı kusursuz (+++) olarak değerlendirildi. Renk parlaklığı ile ilgili genel uyum %86 (CI 0.7774-0.9160) idi. Otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolünün sonuçlarına bakıldığında, tüm örneklerdeki renk parlaklığının iyi olmasına karşın manuel floresan boyama ile boyanan 100 örneğin dördünde renk parlaklığının az olduğu (+1) görüldü. Manuel floresan boyama sistemi ile boyanan yaymaların 95'inde ve otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolü ile boyanan yaymaların ise 96'sında değerlendirme kolaylığı kusursuzdu (+++). Değerlendirme kolaylığı ile ilgili genel uyum %91 (CI 8358-0.9538) idi. Her iki boyama yöntemi arasında değerlendirme kolaylığı açısından anlamlı bir fark yoktu. Manuel floresan boyama ve otomatize RAL boyama sisteminin konvansiyonel protokolünün

sonuçları Tablo 2’de özetlenmiştir.

Manuel floresan boyama sisteminin sonuçları ile otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolünün sonuçları arasında yayma pozitifliğinin derecelendirilmesinde %82 (CI 0.7324-0.8839) uyum saptandı. Kappa katsayısı 0.76 idi ve her iki yöntem arasında önemli derecede uyuşma olduğu görüldü. Manuel floresan boyama sistemi ile boyanan yaymaların üç tanesinde, otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolü ile boyanan yaymaların 16 tanesinde artefakt vardı. Toplamda sonuçlar arasında artefakt varlığı açısından uyum %85 (CI 0.7660-0.9081) idi. Manuel floresan boyama sistemi ile boyanan yaymaların 85’inde ve otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolü ile boyanan yaymaların 96’sında renk par-

laklığı kusursuzdu (+++). Toplamda renk parlaklığı açısından uyum %89 (CI 8121-0.9391) idi. Manuel floresan boyama protokolündeki 100 örnekten dört tanesinde renk parlaklığında azalma (+1) varken, otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolündeki tüm örneklerde renk parlaklığı iyiydi. Manuel floresan boyama sistemi ile boyanan yaymaların 95’inde ve otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolü ile boyanan yaymaların 94’ünde değerlendirme kolaylığı kusursuzdu (+++). Toplamda değerlendirme kolaylığı açısından uyum %89 (CI 8121-0.9391) idi. Her iki yöntem arasında değerlendirme kolaylığı açısından anlamlı fark yoktu. Manuel floresan boyama protokolü ve otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolünün sonuçları Tablo 3’te özetlenmiştir.

**Tablo 2. Manuel Floresan Boyama protokolü ile RAL boyama sistemi konvansiyonel protokolü sonuçlarının karşılaştırılması.**

	Boyama yöntemi			
	Manuel protokol		Konvansiyonel protokol	
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Yayma derecelendirmesi				
1+	38	28	44	28
2+	30	21	27	23
3+	17	16	15	15
4+	15	15	14	14
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Artefakt varlığı				
Yok	97	78	92	74
Var	3	2	8	6
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Renk parlaklığı				
+	4	4	0	0
++	11	11	3	3
+++	85	65	97	77
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Değerlendirme kolaylığı				
+	3	3	1	0
++	2	2	3	2
+++	95	75	96	78
Toplam	100	80	100	80

**Tablo 3. Manuel Floresan boyama protokolü ile RAL boyama sistemi kısa protokolü sonuçlarının karşılaştırılması.**

	Boyama yöntemi			
	Manuel protokol		Kısa protokol	
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Yayma derecelendirmesi				
1+	38	28	47	32
2+	30	21	22	18
3+	17	16	17	16
4+	15	15	14	14
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Artefakt varlığı				
Yok	97	78	84	68
Var	3	2	16	12
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Renk parlaklığı				
+	4	4	0	0
++	11	11	4	4
+++	85	65	96	76
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Değerlendirme kolaylığı				
+	3	3	1	0
++	2	2	5	4
+++	95	75	94	76
Toplam	100	80	100	80

Otomatize RAL boyama sisteminin kısa protokolü ve konvansiyonel protokolünün sonuçları arasında, yayma pozitifliğinin derecelendirmesinde %87 (CI 0.7888-0.9238), artefakt varlığında %88 (CI 0.8004-0.9315), renk parlaklığında %97 (CI 0.9117-0.9935), değerlendirme kolaylığında ise %98 (CI 0.9256-0.9989) uyum vardı. Her iki yöntem arasında yayma değerlendirme, renk parlaklığı, değerlendirme kolaylığı açısından anlamlı fark saptanmadı. Buna karşın, kısa protokolde 100 örneğin 16'sında, konvansiyonel protokolde ise 100 örneğin sekizinde artefakt saptandı (Tablo 4).

Manuel boyama sistemi protokolü yaklaşık 35-40 dakika, otomatize RAL boyama sisteminin konvansi-

yonel protokolü 28 dakika ve kısa protokolü de 19 dakika sürdü. Her çalışmada çapraz kontaminasyonu değerlendirilmek için kullanılan tüm pozitif kontroller pozitif, tüm negatif kontroller ise negatif olarak saptandı ve sonuç olarak otomatize boyama sisteminde ve manuel boyama sisteminde hiçbir örnekte çapraz kontaminasyon saptanmadı.

## TARTIŞMA

Tüberküloz tanısında mikroskopi hızlı sonuç veren, düşük maliyetli ve tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarının prevalansının düşük olduğu koşullarda özgül bir yöntemdir. Buna karşın uygun şekilde boyanmaya, eğitilmiş personele gereksinim göster-

Tablo 4. RAL boyama sistemi kısa protokolü ile konvansiyonel protokolünün sonuçlarının karşılaştırılması.

	Boyama yöntemi			
	Manuel protokol		Konvansiyonel protokol	
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Yayma derecelendirmesi				
1+	47	32	44	28
2+	22	18	27	23
3+	17	16	15	15
4+	14	14	14	14
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Artefakt varlığı				
Yok	84	68	92	74
Var	16	12	8	6
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Renk parlaklığı				
+	0	0	0	0
++	4	4	3	3
+++	96	76	97	77
Toplam	100	80	100	80
	Tüm örnekler	Balgam	Tüm örnekler	Balgam
Değerlendirme kolaylığı				
+	1	0	1	0
++	5	4	3	2
+++	94	76	96	78
Toplam	100	80	100	80

mektedir. Ayrıca tek bir yaymanın mikroskopik incelenmesi ile elde edilen pozitiflik oranı %22 ve %43 oranında değişmektedir. Bu nedenle mikroskop ve boyama kalitesi geliştirilerek yapılan mikroskopik bakının duyarlılığının artırılması, tüberküloz kontrolünde önemli bir adım olacaktır<sup>(10)</sup>. Sunulan çalışma otomatize RAL [Fluo-RAL (bioMérieux-Fransa)] boyama sisteminin manuel floresan boyama yöntemi (BD TB Fluorescent Stain Kit T) ile performans ve boyamanın kalitesi yönünden karşılaştırılmasını ve aralarındaki uyumu değerlendirmeyi amaçlayan bir kalite ve zaman çalışması olarak planlanmıştır.

Çalışmanın sonucunda, yayma derecelendirmesi açısından bakıldığında, RAL boyama sisteminin perfor-

mansının manuel boyamaya eşit olduğu görülmüştür. Değerlendirme kolaylığı açısından her iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına karşın, renk parlaklığı açısından RAL boyama sisteminin manuel protokolden daha iyi olduğu belirlenmiştir. RAL boyama sisteminin kısa ve konvansiyonel protokolleri arasında performans açısından fark saptanmamıştır.

Benzer çalışmalar değerlendirildiğinde, ülkemizde bu konuyla ilgili yapılmış başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatür incelemesinde ise yalnızca bir çalışma olduğu görülmüştür. Ticari florokrom boyama ve RAL boyama sisteminin performanslarının değerlendirildiği ve 58 balgam, 51 balgam dışı solunum örneği

ve 23 solunum dışı örnek olmak üzere toplam 132 klinik örneğin incelendiği bu çalışmada, yayma sonuçlarının değerlendirilmesi açısından her iki yöntem arasında tam bir uyum saptanmış ve RAL boyama sisteminin araştırmayı yapan laboratuvar tarafından günlük rutinde kullanımına karar verilmiştir<sup>(9)</sup>.

Bu çalışmada, RAL otomatize boyama sisteminde hiçbir örnekte çapraz kontaminasyon saptanmamış ve kısa protokol ile 20 dakika içinde yaymaların mikroskopik değerlendirmeye hazır hâle geldiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, RAL otomatize boyama sisteminin kapalı bir sistem olduğu için laboratuvardaki kimyasal kontaminasyonu azaltacağı ve günlük uygulamalarda orta veya yüksek sayıda boyama yapılan özelleşmiş laboratuvarlarda zamandan tasarruf sağlamak ve boyama standardizasyonunu arttırmak için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

#### Teşekkür

Bu çalışma RAL Diagnostics tarafından finanse edilmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (Erişim tarihi: Aralık 2018)
2. Mugusi F, Villamor E, Urassa W, Saathoff E, Bosch RJ, Fawzi WW. HIV co-infection, CD4 cell counts and clinical correlates of bacillary density in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(6):663-9.
3. Chandra TJ, Selvaraj R, Sharma YV. Same day sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: Ziehl-Neelsen versus fluorescent staining. *J Family Med Prim Care*. 2015;4(4):525-8. <https://doi.org/10.4103/2249-4863.174273>
4. Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PloS One*. 2011;6(4):e17601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017601>
5. RAL STAINER-clinical diagnostics products. [https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9304423\\_002\\_gb\\_a\\_ral\\_stainer\\_ok.pdf](https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9304423_002_gb_a_ral_stainer_ok.pdf) (Erişim Tarihi: Aralık 2018).
6. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A guide for the Level III Laboratory* PB86216546. Centers for Disease Control, Atlanta, GA, 1985.
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74. <https://doi.org/10.2307/2529310>
8. Akobeng AK. Understanding randomised controlled trials. *Arch Dis Child*. 2005;90(8):840-4. <https://doi.org/10.1136/adc.2004.058222>
9. Gérôme P, Fabre M, Soler C. Evaluation of the Fluo-RAL (RAL) kit for the identification of mycobacteria by fluorescence microscopy. *Pathol Biol (Paris)*. 2011;59(5):245-7. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.10.012>
10. Getahun H, Harrington M, O'Brien R, Nunn P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet*. 2007;369(9578):2042-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60284-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60284-0)

# Nötropenik Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde Viral Etkenlerin Araştırılması

## Investigation of Viral Agents in the Respiratory Tract Samples of Neutropenic Patients

Harun Ağca\*<sup>©</sup>, Halis Akalın\*\*<sup>©</sup>, Rıdvan Ali\*\*\*<sup>©</sup>, Ezgi Demirdöğen Çetin\*\*\*\*<sup>©</sup>, Burcu Dalyan Cilo\*<sup>©</sup>  
Esra Kazak\*\*<sup>©</sup>, Fahir Özkalemkaş\*\*\*<sup>©</sup>, Beyza Ener\*<sup>©</sup>

\*Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

\*\*Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

\*\*\*Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Bursa

\*\*\*\*Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı, Bursa

### Öz

**Amaç:** Toplum kaynaklı viral solunum yolu enfeksiyonları sık görülmekte ve önemli oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Ancak, hastanede yatan ve immün sistemi baskılanmış hastalarda bu etkenlerin dağılımı iyi bilinmemektedir. Bu çalışmada, hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalardan eşzamanlı alınan nazofarinks sürüntüleriyle (NS) bronkoalveolar lavajı (BAL) örneklerinde viral etkenlerin araştırılması ve iki örneğin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Hastanemiz hematoloji kliniğinde 01.12.2013 ile 31.12.2015 tarihleri arasında yatarak tedavi gören, nötrofil sayısı <500/mL ve ateşi >38°C'in olan ve bronkoskopi yapılmış 50 maligniteli hasta çalışmaya dâhil edildi. NS örneği BAL örneği ile aynı gün alındı. Bu örneklerdeki virüsler, 21 solunum etkenini mültipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirleyebilen ticari bir kitle arandı.

**Bulgular:** Solunum yolları enfeksiyonu şüphesi ile bronkoskopi yapılan 50 hastanın 31'inde (%62) BAL ve/veya eşzamanlı alınan NS örneklerinde en az bir virüs saptandı. Yalnız BAL örnekleri dikkate alındığında hastaların %38'inde, yalnız NS örnekler dikkate alındığında ise hastaların %40'ında viral etken bulundu. Her iki örnekte de coronavirus (NL63, 229E, OC43, HKU1) ile parainfluenza virüs (1, 2, 3, 4) tiplerinin, BAL örneklerinde ise influenza virüs (A, B, A/H1N1) tiplerinin belirgin olarak fazla olduğu belirlendi. BAL örneklerinde belirlenen 25 viral etkenden yalnızca altı tanesine (%24) NS örneklerinde rastlanıldı. Örneklerde viral etkenlere kış aylarında daha fazla olmakla beraber, tüm yıl boyunca rastlanıldı.

**Sonuç:** NS örneklerinde saptanan viral etkenlerin BAL örneklerinde saptananlarla çok uyumlu olmadığı görülmüş ve bu hasta grubunda NS sonuçlarına temkinli yaklaşılması düşünülmüştür. BAL örneklerinde duyarlılığı yüksek yeni tanı yöntemleri ile viral etken aranması ve bulguların klinik verilerle ve diğer patojenlerle değerlendirilmesiyle daha iyi yorum yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Virüs, solunum yolu enfeksiyonu, PCR

### ABSTRACT

**Objective:** Viral respiratory infections are frequently seen and lead to substantial amount of morbidity and mortality. Unfortunately the distribution of these agents are not well known in immunosuppressed inpatients. We aimed to detect viral agents in the nasopharyngeal (NS) and bronchoalveolar (BAL) samples which were concurrently obtained from patients with neutropenic hematologic malignancy.

**Methods:** A total of 50 patients diagnosed of hematologic malignancies with neutrophil counts lower than 500/mL and fever (>38°C) who were hospitalized between 12.01.2013 and 12.31.2015 in the hematology department that were investigated with bronchoscopy were enrolled in the study. NS and BAL samples were obtained on the same day. Viruses in these samples were searched by a commercial multiplex Real-Time PCR assay kit that enables identification of 21 respiratory viral agents.

**Results:** At least one virus was detected in BAL and/or NS samples concurrently obtained from 31 (62%) of 50 patients. Viruses were detected in 38% of BAL and 40% of nasopharyngeal swab samples. More frequently coronaviruses (types NL63, 229E, OC43, and HKU1), and parainfluenza viruses (types 1, 2, 3, and 4) were detected in both samples; while influenza viruses (types A, B, and A/H1N1) were found in BAL samples as predominant agents. Six of the 25 agents detected in BAL samples were also detected in NS samples.

**Conclusion:** It was found that viruses detected in BAL samples were not in much accordance with viruses detected in NS samples, and it was considered that NS results should be evaluated carefully. It was considered that viral analyses in BAL samples should be performed by highly sensitive, new diagnostic methods and taking the clinical findings and other pathogens into consideration would lead to better interpretation of the results.

**Keywords:** Virus, respiratory infection, PCR

### Alındığı tarih:

04.12.2018

### Kabul tarihi:

21.05.2019

### Yayın tarihi:

30.09.2019

### ORCID Kayıtları

H. Ağca 0000-0002-2651-2034

H. Akalın 0000-0001-7530-1279

R. Ali 0000-0001-6486-3399

E. D. Çetin 0000-0002-7400-9089

B. D. Cilo 0000-0002-6158-9360

E. Kazak 0000-0002-7380-2501

F. Özkalemkaş 0000-0001-9710-134X

B. Ener 0000-0002-4803-8206

✉ drharunagca@yahoo.com

## GİRİŞ

Solunum yolu enfeksiyonları çok farklı mikroorganizma grubu ile hem toplum hem de hastane kaynaklı olarak gelişebilir. Etken yelpazesi geniş olan bu enfeksiyonların virüslerle oluşması daha çok çocuk ve ileri yaşlarda karşımıza çıkmakta olup, çoğunlukla toplum kaynaklıdır. Viral etkenler arasında influenza, parainfluenza, respiratory syncytial virus ve picornavirus en sık görülenleridir. Viral solunum yolu enfeksiyonları asemptomatik olabildiği gibi özellikle küçük çocuklar, yaşlılar ve immün sistemi baskılanmış kişilerde pnömoni ve solunum yetmezliğine kadar giden ağır tablolar şeklinde de görülebilir<sup>(1)</sup>.

Hematolojik malign hastalığı olan kişilerdeki önemli komplikasyonlardan biri de enfeksiyonlardır. Bu hastalarda, hem hastalığın özelliğinden hem de kullanılan kemoterapötik ilaçlara bağlı olarak ciddi nötrope ni ve nötrofil fonksiyon bozuklukları vardır. Bu nedenle gelişen enfeksiyonlar hızlı seyir gösterir. İnhalasyonla bulaşan etkenlerin kontrolü ise oldukça zordur. Yapılan bazı çalışmada, malign hastalığı olan ve immün sistemi baskılanmış hastalarda akut solunum yetmezliğinin hayatı tehdit eden bir durum olduğu gösterilmiştir<sup>(2-7)</sup>. Özellikle hematolojik malignite nedeniyle tedavi gören hastalarda mortalite oranları %70'e kadar yükselmektedir<sup>(7-12)</sup>. Solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan bakteriyel ve fungal etkenleri belirlemek daha kolay olup, bunlara karşı antimikrobik ajanlar da oldukça fazla bulunmaktadır. Buna karşın, hem tanısının zor olması hem de tedavi seçeneklerinin azlığı nedeniyle bu hasta grubunda virüslerin etkisi iyi bilinmemektedir. Rutin uygulamalarda viral etkenler aranmadan doğrudan antibiyotik tedavisine başlanmakta, bu durum aşırı ilaç kullanım ile maliyet artışına neden olmaktadır<sup>(1,13)</sup>.

Günümüzde öncelikle virüsleri hedefleyen multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çalışan ticari sendromik kitlerin ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek ilaçların sayısı her geçen gün artmaktadır<sup>(1,14-19)</sup>. Bu durum

özellikle enfeksiyon seyri hızlı olan hematolojik maligniteli hastalar için büyük bir şanstır. Zaten çok fazla ilaç kullanımı olan bu hastalarda hızlı bir şekilde viral etkeni göstermek hem gereksiz ilaç kullanımını azaltacak hem de hedefe yönelik tedaviyi sağlayacaktır. Bu çalışmada amacımız, hastanemiz hematoloji kliniğinde yatan nötropenik hastalardaki viral etkenleri bronkoalveolar lavaj (BAL) ve nazofarinks sürüntülerinde (NS) araştırmak, bu iki örneği karşılaştırmak ve bu hasta grubundaki viral sürveyans ile ilgili katkı sağlamaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Hastalar ve Örnekler:** Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji Kliniği'nde 01.12.2013 ile 31.12.2015 tarihleri arasında yatarak tedavi gören, nötrofil sayısı <500/mL ve ateşi >38°C'ın olan ve solunum yolları enfeksiyonu şüphesi ile bronkoskopi yapılmış 50 maligniteli hasta çalışmaya dâhil edildi. Bronkoskopinin yapıldığı aynı gün hastalardan NS örneği de alındı ve her iki örnek viral etkenlerin araştırılması amacıyla kullanıldı. Çalışmanın insanlardan elde edilen materyallerin kullanıldığı prospektif araştırma olması nedeniyle, "Helsinki Bildirgesi"ne uygun olarak Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 2012-25/17 no'lu karar ile onay alındı.

Nazofaringeal sürüntü örneklerinin alınması için Copan FLOOQSwabs (Copan, İtalya) sürüntü çubuğu kullanıldı. Alınan NS örneği UTM-RT (Copan, İtalya) taşıma besiyerine aktarıldı ve -20°C'da çalışılana kadar saklandı. BAL örneklerinin alınması için "American Thoracic Society" (ATS) klinik uygulama kılavuzlarına göre fiberoptik bronkoskopi uygulandı<sup>(20)</sup>. Akciğer bilgisayarlı tomografi görüntülerindeki lezyon içeren bölgelerden örnekler alındı. Oda ısısındaki steril serum fizyolojikten yaklaşık 100-200 ml, periferik bronşiyol ve alveollara ulaşacak şekilde verildi. Negatif basınç uygulanarak verilen hacmin en az %60'ı çekildi<sup>(21)</sup>. Laboratuvara ulaştırılan örnekler çalışılana kadar -20°C'da saklandı.

**Gerçek Zamanlı PCR:** Nazofaringeal sürüntü ve BAL örneklerinde bulunan viral nükleik asitler (DNA/RNA) "QIAamp Mini Elute virüs Spin" (QIAGEN, Almanya) kiti ile izole edildi. RT-PCR için "FTD respiratory pathogens 21 plus" (Fast-track Diagnostics, Malta) ticari kiti kullanıldı ve çoğaltma işlemi "Rotor-Gene Q" (Qiagen, Almanya) cihazında yapıldı. Multipleks RT-PCR esasına göre çalışılan test ile solunum yolu enfeksiyonu etkeni virüslerden; influenza A, B, influenza A H1N1, human rhinovirus, human coronavirus NL63, 229E, OC43, HKU1, parainfluenza 1, 2, 3, 4, human metapneumovirus, human bocavirus, respiratory syncytial virus A/B, adenovirus, human enterovirus, human parechovirus üretici firma önerileri doğrultusunda arandı.

**İstatistiksel Analiz:** İstatistiksel analiz IBM SPSS Statistics v20 programı (SPSS Inc, Chicago, ABD) kullanılarak ki-kare testi ile gerçekleştirildi.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan hastalardan 10'u kadın (%20), 40'ı erkek (%80) idi. Hastalar 20-77 yaş aralığında olup yaş ortalaması 44 olarak bulundu. Elli hastanın 31'inin (%62) BAL ve/veya NS örneklerinde toplamda 53 viral etken saptandı. Hastalardan 11'inin yalnızca BAL örneğinde, 12'sinin yalnızca NS örneğinde ve 8'inin de her iki örneğinde virüs bulundu. Her iki örnekte de coronavirus (NL63, 229E, OC43, HKU1) ile parainfluenza virüs (1,2,3,4) tiplerinin; BAL örneklerinde ise influenza virüs (A,B, A/H1N1) tiplerinin belirgin olarak fazla olduğu belirlendi (Tablo 1). BAL örneğinde

virüs saptanan hastaların 12'sinde, influenza virüsü saptanan hastaların ise tamamında (5 hasta) eksitus olduğu görüldü.

Tablo 2'de BAL ve NS örneklerinde virüs saptanan 31 hastada görülmektedir. Hastalardan alınan BAL örneklerinin 19 tanesinde (%38) 25 viral etken, NS örneklerinin ise 20 tanesinde (%40) 28 viral etken

**Tablo 2. Bronkoalveolar lavaj ve nazofarinks örneklerinde virüs saptanan hastalar.**

	Yaş	Cinsiyet	Bronkoalveolar lavaj		Nazofarinks sürüntüsü	
			Virüs 1	Virüs 2	Virüs 1	Virüs 2
1	45	E	hCoV HKU1	-	hCoV HKU1	-
2	53	E	hCoV HKU1	PIV1	hCoV HKU1	-
3	30	E	hCoV 229	Flu A H1N1	hCoV 229	-
4	74	K	RSV A/B	HCoV 229	RSV A/B	-
5	36	E	hMPV	-	hMPV	hCoV 229
6	25	E	PIV4	Flu A H1N1	PIV4	-
7	77	K	PIV4	Flu A H1N1	HCoV	hBoV
8	21	K	Flu A	-	RSV A/B	PIV4
9	34	E	hCoV 229	-	-	-
10	20	K	hCoV 229	-	-	-
11	59	E	hCoV 229	PIV3	-	-
12	28	E	hCoV OC43	-	-	-
13	51	E	PIV1	-	-	-
14	56	E	hCoV OC43	-	-	-
15	22	E	hCoV HKU1	-	-	-
16	46	E	hCoV HKU1	-	-	-
17	34	E	PIV3	-	-	-
18	26	K	PIV3	-	-	-
19	57	K	Flu B	-	-	-
20	45	K	-	-	hCoV OC43	PIV3
21	52	E	-	-	PIV3	-
22	30	E	-	-	hCoV 229	-
23	40	E	-	-	PIV3	-
24	22	K	-	-	hRV	-
25	57	E	-	-	hCoV 229	hCoV OC43
26	65	E	-	-	hCoV HKU1	-
27	52	E	-	-	PIV3	-
28	77	E	-	-	hCoV 229	hCoV HKU1
29	60	E	-	-	hCoV 229	hCoV OC43
30	36	E	-	-	Flu A	hPeV
31	54	E	-	-	hCoV HKU1	-

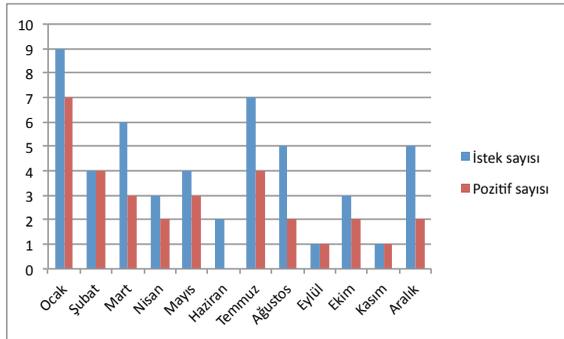
hCoV: coronavirus; PIV: parainfluenza; Flu: influenza; RSV: respiratory syncytial virus; hMPV: human metapneumovirus; hBoV, human bocavirus; hRV, rhinoviruses; hPeV, human parechoviruses

**Tablo 1. Otuzbir hastanın BAL ve nazofaringeal sürüntü örneklerinde saptanan virüslerin sayısı.**

	Bronkoalveolar Lavaj	Nazofaringeal Sürüntü	Toplam
Coronavirus	11 (%44)	15 (%53.8)	26 (%49.1)
Parainfluenza virüs	7 (%28)	6 (%21.4)	13 (%24.5)
İnfluenza virüs	5 (%20)	1 (%3.6)	6 (%11.3)
Respiratory syncytial virus	1 (%4)	2 (%7.1)	3 (%5.7)
Human metapneumovirus	1 (%4)	1 (%3.6)	2 (%3.8)
Human rhinovirus	-	1 (%3.6)	1 (%1.9)
Human bocavirus	-	1 (%3.6)	1 (%1.9)
Human parechovirus	-	1 (%3.6)	1 (%1.9)
Toplam saptanan virüs	25	28	53

saptandı. İki örnek arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Hem BAL hem de NS örneğinde virüs bulunan sekiz hastanın altısında iki tarafta da aynı virüs görüldü. Ancak BAL örneğinde influenza A olan dört hastanın (3, 6, 7, 8 no'lu hastalar) NS örneğinde bu virüse rastlanmadı. Bunun ötesinde BAL örneğinde çeşitli virüsler saptanan 11 hastanın NS örneğinde herhangi bir viral etken bulunamadı. Toplamda BAL örneklerinde belirlenen 25 viral etkenden yalnızca altı tanesine (%24) NS örneklerinde rastlanıldı.

Örneklerin herhangi birinde viral etken saptanmasının oranlarına aylara göre bakıldığında en çok pozitifliğin Ocak ayında görüldüğü (7 hastada), bunu Şubat ve Temmuz aylarının (4 hastada) takip ettiği belirlendi (Şekil 1). Viral enfeksiyonların sık görüldüğü Aralık-Mart döneminde örnek gönderilen 24 hastanın 16'sında (%67); seyrek görüldüğü Nisan-Kasım döneminde örnek gönderilen 26 hastanın 15'inde (%58) pozitiflik saptandı (Şekil 1). Aradaki fark anlamlı bulunmadı.



Şekil 1. İstek yapılan örnek sayısı ve pozitiflik saptanan örnek sayısının aylara göre dağılımı.

## TARTIŞMA

Solunum yolları virüsleri sıklıkla bebek ve küçük çocuklarda görülmekle beraber, erişkinlerde ve özellikle hematolojik malinite nedeniyle bağışıklık sistemi baskılanmış olanlarda sıklığı iyi bilinmemektedir. Bu çalışma, ülkemizde hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda solunum yolu enfeksiyonu etkeni virüsleri araştıran ilk çalışmadır. Solunum yol-

ları enfeksiyonu şüphesi ile bronkoskopi yapılan 50 hasta alınmış ve BAL örneklerindeki viral etkenler araştırılmıştır. Eşzamanlı olarak alınan NS örneklerinin BAL örnekleri ile uyumuna bakılmıştır. Toplamda hastaların %62'sinde, BAL örnekleri dikkate alındığında %38, NS örnekleri dikkate alındığında ise %40'ında viral etken bulunmuştur.

Moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda, erişkinlerde solunum yolları virüslerine %3.6 ile %42.2 oranında rastlanılmıştır. Bu büyük aralık, örneklerin (BAL, NS, trakeal aspirat örnekleri gibi) ve/veya hasta popülasyonlarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Hematolojik maliniteli hastalarla yapılan çalışmalarda ise direkt BAL örneklerinden veya alt solunum yolu enfeksiyonu bulguları olan hastaların çeşitli örneklerinden belirlenen viral etkenlerin oranı %20-57 arasında biraz daha yüksek ve daha dar aralıktadır<sup>(6,7,22,23)</sup>. Bizim çalışmamızda da hematolojik maliniteli hastaların BAL örneklerinde saptadığımız viral etkenlerin oranı (%38) literatürle uyumludur.

Bu çalışmada, BAL ile eş zamanlı NS örneklerine de bakılmıştır. NS örneğinin alınması kolay olup, pahalı ekipman istemeyen, ciddi deneyim gerektirmeyen ve invazif olmayan bir işlemdir. NS örneğinin viral etkeni doğru olarak göstermesi, özellikle trombositopeni nedeniyle bronkoskopi yapılması zor olan hematolojik maliniteli hastalarda son derece önemlidir. Ancak, çalışmamızda iki örnek arasında aynı virüsü belirleme oranı %24 olarak düşük bulunmuş ve en önemli viral solunum yolu etkeni olan influenza virüsü, eksitüsle sonlanan beş hastanın NS örneğinde tespit belirlenememiştir. Sistemik olarak iki örneği aynı anda değerlendiren çalışma sayısı azdır. Soccia ve ark.<sup>(24)</sup> tarafından akciğer nakli yapılan hastalardaki benzer bir karşılaştırmada, çalışmamızda olduğu gibi hastalarının %7'sinde NS örneğinde herhangi bir virüs olmadan BAL örneğinde virüs saptanmıştır. Bunun ötesinde araştırmacılar, yalnızca üst solunum yolları örneklerinde viral etken belirlenmesinin, alt solunum yolları enfeksiyonunu göstermediğini vurgulayarak NS örneğinin alt solunum yolu enfeksiyonlarındaki düşük etkinliğini belirtmişlerdir<sup>(24)</sup>.

Dolayısıyla alt solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gösteren hematolojik maligniteli hastalarda NS örneğindeki viral etkenlere temkinli yaklaşmak ve diğer etiyolojik ajanları da titizlikle aramak gerekir.

Çalışmamızda, her iki örnekte de en fazla saptanan (BAL: %44; NS: %53.8) coronavirus tipleri olmuştur. Coronavirus'ler nezle olgularının %10-30'una sebep olan etkenlerdir. Hematolojik maliniteli hastalarda % 6.7-15.4 oranında alt solunum yolu enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkabilse de asemptomatik saçılmanın %41'lere ulaşabildiği gösterilmiştir<sup>(25)</sup>. Hematolojik maliniteli hastalardaki viral enfeksiyonları derleyen "European Conference on Infections in Leukaemia" (ECIL 4) kılavuzu yeni nükleik asit amplifikasyon testlerinin viral etkenlerin saptanmasını arttırdığını vurgulamaktadır. Bu kılavuza göre alt veya üst solunum yollarında hastalık bulguları olmadan virüsü belirlemek "viral enfeksiyon (asemptomatik)", hastalık bulguları olduğunda virüsü belirlemek "viral enfeksiyon hastalığı" olarak tanımlanır<sup>(26)</sup>. Çalışmamızda, BAL örneği alınan hastaların hepsinde gerek klinik olarak gerekse radyolojik olarak alt solunum yolu enfeksiyon bulguları vardır. Ancak, coronavirus'lerin farklı viral etkenler veya diğer patojenlerle sıklıkla beraber bulunduğu gösterilmiş, enfeksiyon etkeni açısından değerlendirmenin iyi yapılması vurgulanmıştır<sup>(27-31)</sup>. Bu çalışmamızda da altı BAL örneğinde iki virüs varlığı saptanmış, yarısında da coronavirus bulunmuştur. Ancak bu çalışma klinik verileri değerlendiren bir çalışma olmadığından ve yalnızca viral sürveyans amacıyla yapıldığından hastalar gerek bakteriyel veya fungal enfeksiyon gerekse diğer virüs enfeksiyonları açısından incelenmemiştir. Daha ilerle klinik validasyon çalışması planlanmaktadır.

Coronavirus tiplerinden sonra ikinci sırada görülen parainfluenza virüs tiplerinde de %17.9 asemptomatik saçılma vardır<sup>(32)</sup>. Buna karşılık hematolojik maliniteli hastalarda özellikle tip 3 %2-7 oranında enfeksiyon oluşturabilir. Coronavirus'lerden farklı olarak daha agresif bir virüs olup, bronchiolitis obliterans'a kadar gidebilen ağır tablolara yol açabilir<sup>(26)</sup>.

Çalışmamız klinik validasyon çalışması olmadığı için coronavirus'larda olduğu gibi yorum yapmak bu virüs için de doğru değildir.

Çalışmamızda BAL, örneklerinde %20 oranında saptadığımız influenza virüs tipleri ile %4 oranında saptadığımız respiratory syncytial virus tiplerinde asemptomatik saçılma daha enderdir<sup>(26)</sup>. Her ikisinin de viral enfeksiyon hastalığı oluşturma olasılığı yüksek olup, klinik verilerle doğrulanmalıdır. Özellikle influenza virüsü virülansı, hızlı ilerleyişi, aşısı ve tedavisinin bulunmasıyla diğer virüslerden farklıdır ve çalışmamızda da BAL'da influenza virüsü bulunan beş hastanın tamamında eksitus olmuştur. Dolayısı ile bu tür hastalarda rutin olarak BAL örneğinde bu virüsü hızlı sonuç veren RT-PCR vb. testlerle erken saptayıp tedaviyi başlatılabilmek önemlidir. Günümüzde tedavide kullanılan zanamivir, oseltamivir gibi ajanların varlığı, özgül tanı ve tedavinin önemini vurgulamaktadır<sup>(33)</sup>. Ayrıca viral enfeksiyonlara tanı konulmasıyla, hastalara uygulanan gereksiz antibiyotik tedavilerinin getirdiği, maliyet, yan etki ve kaynak israfından kaçınılacaktır<sup>(13)</sup>. Bunun ötesinde influenza virüs salgını olduğunda bu tür hastaların korunması ve yakın çevresinin aşılmasının önemi de unutulmamalıdır<sup>(26)</sup>.

Solunum yolu viral enfeksiyonları çocuklarda ve kış aylarında daha fazla görülmektedir. Ülkemizde çocuk ve erişkinlerde yapılan sürveyans çalışmalarında Kasım-Mart aylarında daha fazla viral etkenlerin saptandığı ve en sık influenza, respiratory syncytial virüs, parainfluenza, adenovirus, ve rhinovirus'lara rastlandığı bildirilmiştir<sup>(34,35)</sup>. Çalışmamızda, en fazla coronavirus tiplerinin olması ve her ne kadar kış aylarında daha fazla olsa da yıl boyunca dalgalı bir seyir göstermesi bir farklılıktır. Çalışmamızda yer alan hastaların nötropenik, immünsupresif tedavi alan hastalardan oluşması bu farklılıkların en önemli nedeni olarak değerlendirilmiştir. Zaten hematolojik hastalarda viral enfeksiyonların yıl boyu görülebileceğinden ve farklı virüslerle karşılaşılabilen söz edilmektedir<sup>(26)</sup>.

Sonuç olarak, bu çalışma hematolojik maliniteli erişkin hastalarda yapılmış viral sürveyans çalışmasıdır. Oldukça özgül bir grupta BAL ve NS örnekleri viral etkenleri açısından karşılaştırılmıştır. NS örneklerinin BAL ile çok uyumlu olmadığı saptanmış, BAL yapılmadığı durumlarda NS örneğinde saptanan virüslere temkinli yaklaşılması düşünülmüştür. Çocuklar ve genel toplumdan farklı olarak bu hasta grubunda coronavirus sıklığı dikkati çekmiş, ancak bu virüsün önemine daha geniş hasta grubuyla yapılan klinik validasyon çalışmalarıyla varılabileceği sonucuna varılmıştır.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (KUAP (T) - 2013/5).

### KAYNAKLAR

1. Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions. *J Clin Virol.* 2005;33(4):341-4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.11.025>
2. Azoulay E, Thiéry G, Chevret S, et al. The prognosis of acute respiratory failure in critically ill cancer patients. *Medicine (Baltimore).* 2004;83(6):360-70. <https://doi.org/10.1097/01.md.0000145370.63676.fb>
3. Azoulay E, Alberti C, Bornstain C, et al. Improved survival in cancer patients requiring mechanical ventilatory support: impact of noninvasive mechanical ventilatory support. *Crit Care Med.* 2001;29(3):519-25. <https://doi.org/10.1097/00003246-200103000-00009>
4. Azoulay E, Mokart D, Rabbat A, et al. Diagnostic bronchoscopy in hematology and oncology patients with acute respiratory failure: prospective multicenter data. *Crit Care Med.* 2008;36(1):100-7. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000295590.33145.C4>
5. López-Medrano F, Aguado JM, Lizasoain M, et al. Clinical implications of respiratory virus infections in solid organ transplant recipients: a prospective study. *Transplantation.* 2007;84(7):851-6. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000282788.70383.8b>
6. Martino R, Rámila E, Rabella N, et al. Respiratory virus infections in adults with hematologic malignancies: a prospective study. *Clin Infect Dis.* 2003;36(1):1-8. <https://doi.org/10.1086/344899>
7. Chemaly RF, Ghosh S, Bodey GP, et al. Respiratory viral infections in adults with hematologic malignancies and human stem cell transplantation recipients: a retrospective study at a major cancer center. *Medicine (Baltimore).* 2006;85(5):278-87. <https://doi.org/10.1097/01.md.0000232560.22098.4e>
8. Ebbert JO, Limper AH. Respiratory syncytial virus pneumonia in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration.* 2005;72(3):263-9. <https://doi.org/10.1159/000085367>
9. Ghosh S, Champlin RE, Englund J, et al. Respiratory syncytial virus upper respiratory tract illnesses in adult blood and marrow transplant recipients: combination therapy with aerosolized ribavirin and intravenous immunoglobulin. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25(7):751-5. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702228>
10. Hohenthal U, Nikoskelainen J, Vainionpää R, et al. Parainfluenza virus type 3 infections in a hematology unit. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(3):295-300. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702776>
11. Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2002;118(1):44-57. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03515.x>
12. Nichols WG, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M. Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;39(9):1300-6. <https://doi.org/10.1086/425004>
13. Lundborg CS, Olsson E, Mölstad S, et al. Antibiotic prescribing in outpatients: a 1-week diagnosis-prescribing study in 5 counties in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(6):442-8. <https://doi.org/10.1080/00365540110080647>
14. Diaz A, Barria P, Niederman M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Chile: the increasing prevalence of respiratory viruses among classic pathogens. *Chest.* 2007;131(3):779-87. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1800>
15. Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2008;41(1):53-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.029>
16. Creer DD, Dilworth JP, Gillespie SH, et al. Aetiological role of viral and bacterial infections in acute adult lower respiratory tract infection (LRTI) in primary care. *Thorax.* 2006;61(1):75-9. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.027441>
17. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods.* 2005;126(1-2):53-63.

- <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.020>
18. Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, et al. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2382-8.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00216-06>
  19. Coiras MT, Pérez-Breña P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol.* 2003;69(1):132-44.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.10255>
  20. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(9):1004-14.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0320ST>
  21. Clinical application of fiberoptic bronchoscopy. In Kitamura S (Ed): *A Colour Atlas of Clinical Application of Fiberoptic Bronchoscopy.* Tokyo, Japan, Wolfe, 1990:107-125.
  22. Garbino J, Soccia PM, Aubert JD, et al. Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: a hospital-based cohort study in adults. *Thorax.* 2009;64(5):399-404.  
<https://doi.org/10.1136/thx.2008.105155>
  23. Drieghe S, Ryckaert I, Beuselinck K, Lagrou K, Padalko E. Epidemiology of respiratory viruses in bronchoalveolar lavage samples in a tertiary hospital. *J Clin Virol.* 2014;59(3):208-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.12.008>
  24. Soccia PM, Aubert JD, Bridevaux PO, et al. Upper and lower respiratory tract viral infections and acute graft rejection in lung transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2010;51(2):163-70.  
<https://doi.org/10.1086/653529>
  25. Milano F, Campbell AP, Guthrie KA, et al. Human rhinovirus and coronavirus detection among allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Blood.* 2010;115(10):2088-94.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-244152>
  26. Hirsch HH, Martino R, Ward KN, Boeckh M, Einsele H, Ljungman P. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): Guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis.* 2013;56(2):258-66.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cis844>
  27. Nickbakhsh S, Thorburn F, Von Wissmann B, McMenamin, Gunson RN, Murcia PR. Extensive multiplex PCR diagnostics reveal new insights into the epidemiology of viral respiratory infections. *Epidemiol Infect.* 2016;144(10):2064-76.  
<https://doi.org/10.1017/S0950268816000339>
  28. Morikawa S, Kohdera U, Hosaka T, Ishii K, Akagawa S, Hiroi S, Kase T. Seasonal variations of respiratory viruses and etiology of human rhinovirus infection in children. *J Clin Virol.* 2015;73:14-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.10.001>
  29. Lagare A, Maïnassara HB, Issaka B, Sidiki A, Tempia S. Viral and bacterial etiology of severe acute respiratory illness among children <5 years of age without influenza in Niger. *BMC Infect Dis.* 2015;14:15:515.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-015-1251-y>
  30. Liu T, Li Z, Zhang S et al. Viral etiology of acute respiratory tract infections in hospitalized children and adults in Shandong Province, China. *Virol J.* 2015;14;12:168.  
<https://doi.org/10.1186/s12985-015-0388-z>
  31. Uhlenhaut C, Cohen JI, Pavletic S, et al. Use of a novel virus detection assay to identify coronavirus HKU1 in the lungs of a hematopoietic stem cell transplant recipient with fatal pneumonia. *Transpl Infect Dis.* 2011;14(1):79-85.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2011.00657.x>
  32. Peck AJ, Englund JA, Kuypers J, et al. Respiratory virus infection among hematopoietic cell transplant recipients: evidence for asymptomatic parainfluenza virus infection. *Blood.* 2007;110(5):1681-8.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-060343>
  33. Khazeni N, Bravata DM, Holty JE, Uyeki TM, Stave CD, Gould MK. Systematic review: safety and efficacy of extended-duration antiviral chemoprophylaxis against pandemic and seasonal influenza. *Ann Intern Med.* 2009;151(7):464-73.  
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-7-200910060-00143>
  34. Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, ve ark. Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum viruslarının prevalansı ve mevsimsel dağılımı, 2002-2014. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(2):188-200.  
<https://doi.org/10.5578/mb.9024>
  35. Appak Ö, Duman M, Belet N, Sayiner AA. Viral respiratory infections diagnosed by multiplex polymerase chain reaction in pediatric patients. *J Med Virol.* 2019; 91(5):731-7.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.25379>

# Mersin’de Tüberküloz Plörezili Otuz Sekiz Hastanın Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi<sup>§</sup>

## Retrospective Evaluation of 38 Patients with Tuberculous Pleurisy in Mersin

Mahmut Ülger\*<sup>®</sup>, Nurbanu Kurnaz\*\*<sup>®</sup>, Seda Tezcan Ülger\*\*<sup>®</sup>, Nuran Delialioğlu\*\*<sup>®</sup>, Gönül Aslan\*\*<sup>®</sup>

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

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

### Öz

**Amaç:** Tüberküloz plörezi (TP), tüberküloz (TB) lenfadenitten sonra ekstrapulmoner TB’un en yaygın görülen ikinci şeklidir ve gelişmekte olan ülkelerde eksüdatif pleval efüzyonun başlıca nedenlerinden biridir. Bu çalışmada, TP şüpheli hastaların demografik, mikrobiyolojik ve histopatolojik özelliklerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Ocak 2006-Şubat 2018 tarihleri arasında TP tanısı konmuş 38 olgunun klinik, mikrobiyolojik ve histopatolojik özellikleri retrospektif olarak değerlendirildi. TP tanısında altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemine ilave olarak çalışmaya, klinik örneğinde aside dirençli basil (ARB) görülen olgular ve/veya histopatolojik inceleme ile TP tanısı konulan olgular dâhil edildi.

**Bulgular:** TP tanılı 38 hastanın 31 (%81.6)’inde kültür pozitifliği (pleval sıvı %39.5; pleval doku %42.1) ve 30 (%79)’unda histopatolojik inceleme (pleval sıvı %31.6; pleval doku %47.4) ile kronik granülomatöz inflamasyon saptandı. Olguların 5 (%13.1)’inde yalnızca kültür pozitifliği, 3 (%7.9)’ünde ise yalnızca histopatolojik incelemenin pozitif olduğu belirlenirken, 23 (%60.5) olgunun her iki yöntemle pozitif olduğu belirlendi. Hastaların 22’si (%57.9) erkek, 16’sı (%42.1) kadın ve yaş ortalamaları 43 (2-82) olarak bulundu. Olgularımızda en sık rastlanan semptomlar nefes darlığı, öksürük ve göğüs ağrısı olarak belirlendi.

**Sonuç:** Pleval efüzyonlu olgularda hastanın kliniğine göre mikrobiyolojik ve histopatolojik tanı yöntemlerinin birlikte uygulanmasının, tanı koyma oranını önemli ölçüde arttırdığı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Tüberküloz, tüberküloz plörezi, kültür, histopatoloji

### ABSTRACT

**Objective:** Tuberculous pleurisy (TP) is the second most common form of extrapulmonary tuberculosis after tuberculous lymphadenitis and in developing countries it is one of the major causes of exudative pleural effusion. In this study, we aimed to retrospectively evaluate the mycobacteriological and histopathological results and demographic data of patients with suspect TP.

**Method:** Between January 2006 and February 2018; clinical, microbiological and histopathological features of 38 patients with TP were retrospectively evaluated. In addition to the culture method, considered to be the gold standard in the diagnosis of TP, cases with positive acid-fast bacilli (AFB) in their clinical specimens and/or cases that were diagnosed histopathologically as TP were included in this study.

**Results:** Of the 38 TP cases, 31 (81.6%) were culture positive (pleural fluid 39.5%; pleural tissue 42.1%), and chronic granulomatosis inflammation was detected in 30 (79%) cases (pleural fluid 31.6%; pleural tissue 47.4%) with histopathological examination. While 5 (13.1%) of the cases were positive only with culture and 3 (7.9%) were positive only with histopathological examination, 23 (60.5%) cases were found to be positive by both methods. Of these cases, 22 (57.9%) were male, 16 (42.1%) were female and the mean age was 43 (2-82) years. The most common symptoms among the cases were respiratory disorder, cough and chest pain.

**Conclusion:** In cases with pleural effusion, combined use of microbiological and histopathological diagnostic methods is thought to increase the diagnostic rate significantly.

**Keywords:** Tuberculosis, tuberculous pleurisy, culture, histopathology

### Alındığı tarih:

22.03.2019

### Kabul tarihi:

29.05.2019

### Yayın tarihi:

30.09.2019

### ORCID Kayıtları

M. Ülger 0000-0001-6649-4195

N. Kurnaz 0000-0001-8461-6723

S. Tezcan Ülger 0000-0002-0823-3680

N. Delialioğlu 0000-0001-8535-3291

G. Aslan 0000-0002-1221-7907

✉ mahmutulg@yahoo.com.tr

## GİRİŞ

Tüberküloz (TB), dünya genelinde en yaygın ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2017 Global TB raporuna göre, TB nedeni ile HIV negatif bireylerde 1.3 milyondan fazla kişi yaşamını kaybetmektedir. 2016 yılında 10.4 milyon kişinin TB hastalığına yakalandığı belirtilmiştir. TB genellikle akciğerleri etkiler (pulmoner TB) ancak vücudun diğer bölgelerine (ekstrapulmoner TB-EPTB) de yayılabilir<sup>(1)</sup>. EPTB, tüm TB olgularının yaklaşık %15'ini oluşturur<sup>(2)</sup>. Tüberküloz plörezi (TP), TB lenfadenitten sonra EPTB'nin en yaygın görülen ikinci şeklidir ve gelişmekte olan ülkelerde coğrafi olarak %4-25 oranları arasında değişmekle birlikte, eksüdatif plevral efüzyonun başlıca nedenlerinden biridir<sup>(3,4)</sup>. Ülkemizde 2017 yılı verem savaş raporuna göre TB insidansı yüz binde 18 olup, EPTB formları tüm TB olgularının yaklaşık olarak %35.6'sını oluşturmaktadır. TP, EPTB formları arasında %23.5 oranı ile ikinci sıklıkta görülmektedir<sup>(5)</sup>. *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu TP, plevral boşlukta yoğun bir sıvı ve inflamatuvar hücre birikimi ile karakterizedir. TP, TB'nin endemik olduğu bölgelerde plevral efüzyonun en yaygın nedenidir. Hastaların %3-5'inde plevral tutulum görülürken, TB'nin endemik olduğu bölgelerde bu oran %30'a kadar yükselebilmektedir<sup>(6,7)</sup>. Akciğer TB'si ile birlikte TP; HIV pozitif hastalarda, negatif hastalara göre sırasıyla Güney Afrika'da %38'e %20, Zimbabve'de %27'ye %13 ve Uganda'da %23'e %11 olmak üzere daha yüksek oranda görülmektedir<sup>(7)</sup>.

Tanı konulamayan plevral efüzyonu olan hastalarda TP'den şüphelenilmelidir<sup>(8)</sup>. TP tanısı, plevral sıvı ve plevral biyopsi örneklerinin biyokimyasal analizi, histopatolojik ve mikrobiyolojik incelemeleri ile konulmaktadır<sup>(9)</sup>. TP tanısında altın standart yöntem plevral sıvı veya plevral biyopsi örneklerinde *M. tuberculosis*'in saptanmasıdır. Tanı mikroskopi ve/veya kültürde aside dirençli basil (ARB) varlığı ya da kazeöz granülomların histopatolojik olarak gösterilmesi ile konulmaktadır<sup>(10)</sup>. Klinik örneklerde basil varlığının azlığından dolayı TP tanısı koymak zordur.

TP tanısı, plevral biyopsi, tıbbi ya da cerrahi torakoskopi gibi invaziv, pahalı ve zaman gerektiren işlemler ile doğrulanmalıdır<sup>(2)</sup>.

Bu retrospektif çalışmada TP şüpheli olguların demografik, mikrobiyolojik ve histopatolojik özelliklerinin değerlendirilmesi ve kültürde izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının anti-TB ilaç duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2006-Şubat 2018 tarihleri arasında eksüda vasfında plörezi olan 38 olgu (plevral sıvı [n=20, %52.6] ve plevral doku [n=18, %47.4]) dahil edildi. Plevral doku örnekleri videotorakoskopi yardımıyla akciğer cerrahisi (VATS) ve açık biyopsi (torakotomi) yapılarak alındı ve örnekler işleme alınmadan önce steril havanda ezildikten sonra Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) tarafından önerilen N-asetil-L-sistein (NALC)-NaOH yöntemiyle homojenize ve dekontamine edildi<sup>(11)</sup>. Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası kültür Lowenstein-Jensen [LJ] ve sıvı otomatize sistemler (BACTEC-460 ve/veya MGIT 960) ile yapılarak yaymalar hazırlandı. Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile yaymalarda ARB varlığı araştırıldı. Kültürde üremesi olan izolatlarda *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) varlığı mikroskopik ve makroskopik koloni morfolojisi ile biyokimyasal yöntemler (nyasin birikimi, nitrat redüksiyon, katalaz aktivitesi, para-nitrobenzoik asit [PNB]'li besiyerinde üreme) kullanılarak araştırıldı<sup>(12)</sup>. İzolatların birinci seçenek anti-TB ilaçlardan streptomisin [SM], izoniazid [INH], rifampisin [RIF] ve etambutole [EMB] karşı duyarlılıkları sıvı otomatize sistemler ile belirlendi<sup>(13)</sup>.

Klinik örneğinin yaymasında ARB varlığı saptanan, kültüründe MTC izole edilen ve/veya histopatolojik inceleme sonucu granümatöz plörit tanısı alan hastalar çalışmaya dâhil edildi. Her hastanın yalnızca bir

örneği çalışmaya dahil edilerek, tekrarlayan örnekler çalışma dışı bırakıldı. TP tanısı alan hastaların demografik özellikleri, önceden geçirilmiş TB öyküsü, aile içi temas, klinik semptomlar, TP'ye eşlik eden komorbid hastalıklar ve sigara içme öyküsü retrospektif olarak incelendi. Bütün hastalar HIV ko-enfeksiyonu yönünden negatifti.

## BULGULAR

Çalışmaya klinik örneğinin mikrobiyolojik ve/veya histopatolojik incelenmesi sonucu TP tanısı alan 38 olgu dâhil edildi. Bu olguların 31 (%81.6)'inde kültür pozitifliği, yedisinde (%18.4) ARB pozitifliği ve 30 (%79)'unda histopatolojik inceleme ile kronik granülomatöz inflamasyon saptandı (Tablo 1). Olguların 5 (%13.1)'inde yalnızca kültür pozitifliği, 3 (%7.9)'ünde ise yalnızca histopatolojik incelemenin pozitif olduğu belirlenirken, 23 (%60.5) olgunun her iki yöntemle pozitif olduğu belirlendi (Tablo 2). Hastaların 22 (%57.9)'si erkek, 16 (%42.1)'si kadındı ve yaş ortalamaları 43 (2-82) olarak bulundu. Kültür pozitif 31 hastanın ikisinde (%6.5) INH, birinde (%3.2) SM ve birinde (%3.2) ise hem INH hem de SM direnci saptandı. Geri kalan 27 (%87.1) hastada ise primer anti-TB ilaçlara direnç saptanmadı. Olgularımızda en sık rastlanan semptomlar nefes darlığı (n=25, %66 [bu hastaların %21'inde öksürük, %15.8'inde göğüs ağrısı mevcuttu], öksürük (n=12, %32 [bu hastaların %21'inde nefes darlığı ve %13.2'sinde göğüs ağrısı mevcuttu] ve göğüs ağrısı (n=9, %23.6 [bu hastaların %15.8'inde nefes darlığı, %13.2'sinde öksürük mevcuttu] olarak belirlendi. Hastaların on sekizinde (%47.4) sigara kullanım öyküsü, dördünde (%10.5)

**Tablo 2. Tüberküloz plörezili olguların ARB, kültür ve histopatolojik bulguların birlikte görülme oranları.**

	Plevral Sıvı n (%)	Plevral Doku n (%)	Toplam n (%)
Kültür (+) ARB (+) Histopatoloji (+)	-	2 (5.3)	2 (5.3)
Kültür (+) ARB (-) Histopatoloji (+)	9 (23.7)	14 (36.8)	23 (60.5)
Kültür (+) ARB (-) Histopatoloji (-)	5 (13.1)	-	5 (13.1)
Kültür (+) ARB (+) Histopatoloji (-)	1 (2.6)	-	1 (2.6)
Kültür (-) ARB (+) Histopatoloji (+)	-	2 (5.3)	2 (5.3)
Kültür (-) ARB (-) Histopatoloji (+)	3 (7.9)	-	3 (7.9)
Kültür (-) ARB (+) Histopatoloji (-)	2 (5.3)	-	2 (5.3)
Toplam	20	18	38

malignite, üçünde (%7.9) aile içinde ya da yakın çevresinde TB öyküsü (yakın temas), üçünde (%7.9) asbest maruziyeti, üçünde (%7.9) hipertansiyon, üçünde (%7.9) diyabetes mellitus, ikisinde (%5.3) kronik böbrek yetmezliği, birinde (%2.6) önceden geçirilmiş TB ve bir hastada (%2.6) Behçet hastalığı tespit edildi. Göğüs radyografilerinin değerlendirilmesi sonucu 16 (%42.1) hastada sağ plevral efüzyon, 20 (%52.6) hastada sol plevral efüzyon, iki (%5.3) hastada ise biletoral efüzyon belirlendi (Tablo 3).

**Tablo 1. Tüberküloz plörezili olguların mikrobiyolojik ve histopatolojik bulguları.**

	ARB		LJ/MGIT		Histopatoloji	
	Pozitif (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	Negatif (%)
Plevral sıvı	3 (7.9)	17 (44.7)	15 (39.5)	2 (5.3)	12 (31.6)	8 (21)
Plevral doku	4 (10.5)	14 (36.8)	16 (42.1)	5 (13.1)	18 (47.4)	-
Toplam	7 (18.4)	31 (81.6)	31 (81.6)	7 (18.4)	30 (79)	8 (21)

**Tablo 3. TP'li olguların demografik özellikleri.**

Demografik veriler	n	%
Sigara öyküsü	18	47.4
Malignite (akciğer kanseri, over ca, larinks ca, akut miyeloid lösemi)	4	10.5
TB'li hasta ile temas	3	7.9
Asbestozis	3	7.9
Hipertansiyon	3	7.9
Diyabetes mellitus	3	7.9
Kronik böbrek yetmezliği	2	5.3
Önceden TB geçirme	1	2.6
Behçet hastalığı	1	2.6
<b>Efüzyon lokalizasyonu</b>		
Sağ	16	42.1
Sol	20	52.6
Bilateral	2	5.3

## TARTIŞMA

Plevral tüberküloz eksuda özelliğindeki plevral sıvıların en yaygın nedenlerinden biridir ve TB prevalansının yüksek olduğu ülkelerde mikobakteri antijenlerine karşı gelişen gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna bağlı olarak oluşur. TB prevalansının düşük olduğu ülkelerde ise, plevra tüberkülozunun çoğunlukla TB reaktivasyonunun bir komplikasyonu sonucunda oluştuğu kabul edilmektedir<sup>(14)</sup>. Türkiye gibi TB prevalansının yüksek olduğu ülkelerde TP daha çok primer enfeksiyonun komplikasyonu sonucu ortaya çıktığı için genç erişkin ve adölesanlarda daha sık rastlanmaktadır<sup>(15)</sup>.

Tüberküloz plörezinin kesin tanısı balgamda ve plevral örneklerde MTC'nin üretilmesi veya plevral biyopsilerde kazeöz granülomların saptanması ile konmaktadır. Balgam kültürleri hem pulmoner hem de TP'li hastaların %30-50'sinde pozitifken, plevral efüzyonu olan hastaların örneklerinde ise yalnızca %4 oranında kültür pozitifdir<sup>(16)</sup>. TP tanısında duyarlılık plevral sıvı kültüründe %10-35, plevral iğne biyopsisi histopatolojisinde %56-82 ve plevral iğne biyopsi kültüründe %39-65 arasında değişmektedir<sup>(16)</sup>. Plevral sıvının EZN boyama ile doğrudan incelenmesi 10.000 basil/ml yoğunluğu gerektirmektedir. Bu nedenle ARB ile olguların saptanma oranı %10'dan daha düşüktür. HIV ile enfekte hastalarda bu oran %20 olarak bildirilmektedir. Kültür pozitifliği için 10 ile 100 arasında

canlı basil gerekir. Kültür duyarlılığı %12-70 arasında değişmekle birlikte, pek çok çalışmada %30 olarak bildirilmiştir<sup>(17)</sup>.

Marjani ve ark.'nın<sup>(18)</sup> yaptıkları çalışmada, HIV pozitif hastalarda plevral sıvıda kültür pozitifliği %63.6, HIV negatif hastalarda ise %29.5 olarak bildirilmiştir. Mihmanlı ve ark.<sup>(19)</sup> TP tanılı 105 olguda plevral sıvıda kültür pozitifliğini %5 olarak belirlemişlerdir. Tüm hastaların plevral sıvı yaymalarında ise ARB pozitifliği belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Valdes ve ark.<sup>(20)</sup> TP tanılı 254 hastada plevral sıvı örneklerinde ARB ve kültür pozitifliğini sırası ile %5.5 ve %36.6 olarak belirlemişlerdir. Plevral dokuda ise ARB ve kültür pozitifliğini sırası ile %25.8 ve %56.4 olarak bildirmişlerdir. Asan ve ark.<sup>(21)</sup> plevral biyopsi yapılan 33 olguda kültür pozitifliğini %54.5 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda plevral sıvıdaki kültür pozitifliği %39.5 oranı ile diğer çalışmalara göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Plevral dokudaki ARB ve kültür pozitifliği sırası ile %5.3 ve %42.1 oranı ile diğer çalışmalara göre daha düşük oranda tespit edilmiştir (Tablo 1 ve 2).

İnce iğne biyopsisi son 50 yılda TP tanısı koymanın en yaygın yolu olmuştur. TP tanısı pariyetal plevrada granülomun gösterilmesi ile konabilir. Mantar hastalıkları, sarkoidoz ve romatoid plörit gibi diğer hastalıklar da granülom oluşumuna neden olsa da granülomatöz plöritli hastaların %95'inden fazlasında TB vardır<sup>(8)</sup>. Plevral doku; kapalı plevral biyopsi, torakoskopi veya açık cerrahi biyopsilerle elde edilebilir. TB'nin endemik olduğu dünyanın pek çok yerinde torakoskopi ve açık cerrahi uygulamalar sınırlı olduğu için plevral sıvı analizinde sonuç alınmadığı zaman plevral biyopsi yeğlenir. Ultrason eşliğinde alınan plevral biyopsilerde TP tanısı %90 başarıya sahiptir<sup>(10)</sup>. Cohen ve ark.<sup>(8)</sup> TP tanılı 248 hastada yaptıkları çalışmada, plevral ince iğne biyopsisinin histopatolojik incelenmesinde 198 hastada (%81) granülom belirlemişlerdir. Diacon ve ark.<sup>(22)</sup> tarafından yapılan çalışmada, ince iğne biyopsisinde histoloji, kültür ve ikisinin birlikte duyarlılığı sırası ile %66, %48 ve %79 oranlarında bildirilirken, torakoskopi ile alınan örnek-

lerde bu oranlar %100, %76 ve %100 olarak bildirilmiştir. Ruan ve ark.<sup>(23)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada ise %74 oranında TP tanısı konulduğu belirtilmiştir. TP tanısında plevral sıvının histopatolojik ve mikrobiyolojik incelenmesinin birlikte yapıldığı bir çalışmada ise %86 oranında pozitiflik bildirilmiştir<sup>(16)</sup>. Ülkemizde Mihmanlı ve ark.'nın<sup>(19)</sup> yaptığı bir çalışmada, plevral biyopsi uygulanan 81 hastanın 59 (%72.8)'unda histopatolojik pozitiflik belirlenmiştir. Ülkemizdeki diğer çalışmalarda ise histopatoloji pozitifliği %50-90 arasında bildirilmektedir<sup>(21,24,25)</sup>. Çalışmamızda, diğer çalışmalar ve ülkemizdeki çalışmalarla benzer oranlarda histopatolojik ve/veya mikrobiyolojik incelemesi yapılan 38 örneğin 30 (%79)'unda pozitiflik saptanmıştır. Olgularımızın 3 (%7.9)'ünde yalnızca histopatolojik inceleme ile pozitiflik, 5 (%13.1)'inde ise yalnızca kültür pozitifliği tespit edilirken, 23 (%60.5) olguda hem mikrobiyolojik hem de histopatolojik yöntemle pozitiflik saptandı (Tablo 2). TP tanısında her iki yöntemin birlikte kullanılması tanı oranını arttırmaktadır.

Plevral TB olan hastalar genellikle genç erkeklerdir (%70)<sup>(26)</sup>. Solaria ve ark.'nın<sup>(3)</sup> yaptıkları çalışmada, TP erkek cinsiyet ve TB'li hastalar ile temasla ilişkili bulunmuştur. Babalık ve ark.'nın<sup>(27)</sup> 174 hastada yaptığı çalışmada, 35 yaş altındaki hastalarda TP görülme sıklığı %51.1; 35 yaş üstü hastalarda ise %48.9 olarak bildirilmiştir. TP görülme sıklığı ise erkek ve kadın hastalarda sırası ile %64.9 (174/113) ve %35.1 (174/61) olarak bildirilmiştir. Ceylan ve ark.'nın<sup>(28)</sup> yaptıkları çalışmada, TP tanısı alan 35 olgunun 29 (%82.8)'u erkek, altısı (%17.1) kadın hasta olarak belirlenmiştir. TP'nin 29 (%82.9) yaş ve altındaki hastalarda daha sık görüldüğü belirtilmiştir. İkinci ve ark.'nın<sup>(29)</sup> yaptıkları çalışmada, TP tanılı 50 olgunun 27 (% 54)'si erkek, 23 (%46)'ü kadın hasta olarak belirlenirken, TP'nin 40 yaş (%86) altındaki bireylerde daha fazla görüldüğü belirtilmiştir. Çalışmamızda, diğer çalışmalarla benzer şekilde TP tanılı 38 olgunun 22 (%58)'si erkek, 16 (%42)'si kadın hastalarda belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda TP'de yaş ortalamaları 34-42 arasında bildirilmiştir<sup>(30-32)</sup>. Bizim çalışmamızda da ülkemizde yapılan çalışmalara ben-

zer şekilde yaş ortalaması 43 olarak belirlenmiştir.

Tüberküloz plörezide mikobakteriyel yük düşük olduğu için pek çok olguda kendiliğinden iyileşme görülür. Ancak yapılan çalışmalarda, tedavi almayan TP olgularının %65'inde beş yıl içinde akciğer TB'si geliştiği bildirilmiştir<sup>(16)</sup>. Bu yüzden TP'nin tanı ve tedavisi önemlidir. DSÖ verilerine göre TP için önerilen tedavi rejimi aktif akciğer TB'sindeki gibidir. Buna göre ilk 2 ay INH, RIF, pirazinamid ve EMB'den oluşan dörtlü ilaç kombinasyonu, sonraki 4 ay ise INH ve RIF'den oluşan ikili kombinasyonla tedavinin 6 aya tamamlanması önerilmektedir<sup>(33)</sup>. Baumann ve ark.'nın<sup>(34)</sup> Amerika'da yaptıkları çalışmada, TP şüpheli hastaların %6'sında INH direnci, %9.9'unda birinci seçenek ilaçlardan en az birine direnç belirlendiği bildirilmiştir. Shu ve ark.'nın<sup>(35)</sup> Tayvan'da yaptıkları çalışmada, TP'li hasta izolatlarının %10'ununda birinci seçenek ilaçlardan en az birine direnç ve %2'sinde ise çok ilaca direnç saptandığı bildirilmiştir. Asan ve ark.'nın<sup>(21)</sup> yaptıkları çalışmada, ilaç duyarlılık testi çalışılan beş olgunun ikisinde 4 majör ilaca (INH, RIF, SM, EMB) direnç, bir olguda ise yalnızca INH'ye direnç saptandığı belirtilmiştir. Çalışmamızda, kültürde MTC izole edilen 31 hastanın ikisinde (%6.4) INH, birinde (%3.2) SM, birinde (%3.2) ise hem INH hem de SM direnci saptanırken, geri kalan 27 (%87) hastada primer anti-TB ilaçlara direnç saptanmamıştır.

Tüberküloz plörezi genellikle akut veya subakut seyreden bir hastalıktır. En sık görülen klinik semptomlar öksürük (%70) ve plöritik göğüs ağrısı (%70)'dir. Çoğu hastada ateş, dispne, çabuk yorulma ve kilo kaybı görülmektedir<sup>(8)</sup>. Chan ve ark.'nın<sup>(36)</sup> Çin'de yaptıkları çalışmada, en sık rastlanan semptomlar öksürük ve ateş (%71), kilo kaybı (%55), göğüs ağrısı (%53), dispne (%48) olarak bildirilmiştir. Khan ve ark.'nın<sup>(14)</sup> yaptığı çalışmada, olgularda en sık görülen klinik semptomların öksürük (%91.2) ateş (%86.2), göğüs ağrısı (%63.8) ve gece terlemesi (%65) olduğu rapor edilmiştir. İkinci ve ark.'nın<sup>(29)</sup> yaptıkları çalışmada, olgularda en sık yan ağrısı (%82) saptanmakla birlikte, bunu öksürük (%64), ateş (%38) ve nefes darlığı (%36)'nın takip ettiği bildirilmiştir. Aktoğu ve

ark.'nın<sup>(37)</sup> yaptığı çalışmada, en yaygın semptomlar öksürük (%90), balgam (%65), kilo kaybı (%64), gece terlemesi (%62), göğüs ağrısı (%37), hemoptizi (%29) ve dispne (%24) olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda da en sık rastlanan klinik semptomlar nefes darlığı, öksürük, göğüs ağrısı ve ateş olarak belirlenmiştir.

Tüberküloz plörezi efüzyonlar tipik olarak tek taraflıdır, sıvı miktarı az veya orta hacimdedir ve olguların yaklaşık %30'unda sıvı loküle özelliindedir<sup>(26)</sup>. Valdes ve ark.'nın<sup>(20)</sup> yaptığı çalışmada, TP'li olguların %55.9'unda sağda, %42.5'inde solda, %1.6'sında bilateral efüzyon saptandığı bildirilmiştir. Soe ve ark.'nın<sup>(38)</sup> yaptıkları çalışmada, TP'li olguların %58.3'ünde sağda, %39.8'inde solda, %1.9'unda bilateral efüzyon saptandığı bildirilmiştir. Babalık ve ark.'nın<sup>(27)</sup> yaptıkları çalışmada, plevra efüzyonlarının %50.6'sı sağda, %47.1'inin solda saptandığı bildirilmiştir. Uçar ve ark.'nın<sup>(39)</sup> yaptığı çalışmada ise, plevra efüzyonlarının %37.8'inin sağda, %54'ünün solda, %8.1'inin bilateral olarak saptandığı belirtilmiştir. Çalışmamızda, olguların %42.1'inde sağda, %52.6'sında solda, %5.3'ünde bilateral efüzyon saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, TP'li olgularda efüzyonların genellikle tek taraflı olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde tek taraflı plevral efüzyona daha sık rastlanmıştır (Tablo 3).

Akciğer ya da akciğer dışı çeşitli hastalıkların varlığında plevral efüzyon gelişebilir<sup>(40)</sup>. Pnömoni hastalarının %15-44'ünde plevral efüzyon görülür. Kanser hastalarında, kanser hücreleri plevral boşluk içermemelerine rağmen, kanserin dolaylı etkisi ile plevral efüzyon geliştirebilirler. Malign plevral efüzyonların %75'inden fazlası akciğer, meme, yumurtalık veya lenfoma neoplazmlarından kaynaklanır. Nefrotik sendromlu hastaların yaklaşık %20'sinde plevral efüzyon gelişir<sup>(41)</sup>. Yang ve ark.'nın<sup>(42)</sup> yaptığı çalışmada, TP'li olgularda diyabet insidansı, alkolizm ve romatoid artrit normal popülasyona göre daha yüksek görüldüğü belirtilmiştir. Babalık ve ark.'nın<sup>(27)</sup> yaptıkları çalışmada, komorbid hastalıklar hipertansiyon, diyabetes mellitus, malignite (mesane, meme ve tiroid) ve gastrointestinal rahatsızlıklar (gastrit, ülser) olarak

bildirilmiştir. Çalışmamızda, dört olguda malignite, iki olguda kronik böbrek yetmezliği saptanmıştır (Tablo 3).

Asbest maruziyetine bağlı olarak efüzyonlar meydana gelebilmektedir. Prevalans doza bağlıdır ve ağır asbest maruziyeti %0.2 ila %7 arasında değişir<sup>(43)</sup>. Çalışmamızda, üç olguda asbest maruziyeti saptanmıştır.

Tüberküloz geçirme ve/veya TB'li hasta ile yakın temas öyküsü olan TP olgularının oranı çeşitli çalışmalarda %4-19 arasında bildirilmiştir<sup>(30,44,45)</sup>. Çalışmamızda, olguların birinde (%2.6) TB geçirme, üçünde (%7.9) TB'li hasta ile yakın temas saptanmıştır.

Tüberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelerde klinik şüphesi olan plevral efüzyonlu olgularda TP göz önünde bulundurulmalıdır. TP tanısında, plevral doku ve plevral sıvı örneklerinde bakterinin üretilmesi ve anti-TB ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi için kültür güvenilir ve vazgeçilmez bir yöntemdir. Plevral efüzyonlu olgularda hastanın kliniğine göre mikrobiyolojik ve histopatolojik tanı yöntemlerinin birlikte uygulanmasının, tanı koyma oranını önemli ölçüde arttırdığı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report. Geneva: WHO Press, 2017. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr2017\\_main\\_text.pdf](https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf) (erişim Tarihi: Aralık 2018)
2. Christopher JD, Dinakaran S, Gupta R, James P, Isaac B, Thangakunam B. Thoracoscopic pleural biopsy improves yield of Xpert MTB/RIF for diagnosis of pleural tuberculosis. *Respirology*. 2018;23(7):714-17. <https://doi.org/10.1111/resp.13275>
3. Solari L, Soto A, Van der Stuyft P. Development of a clinical prediction rule for the diagnosis of pleural tuberculosis in Peru. *Int J Infect Dis*. 2018;69:103-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.01.026>
4. Skouras VS, Kalomenidis I. Drug resistance in patients with tuberculous pleural effusions. *Curr Opin Pulm Med*. 2018;24(4):374-9. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000483>
5. TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye'de Verem Savaş 2017

- Raporu. TC Sağlık Bakanlığı; 2017. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/haberler/verem-savas-raporu-2016-2017/Turkiyede\\_Verem\\_Savasi\\_2017\\_Raporu.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/haberler/verem-savas-raporu-2016-2017/Turkiyede_Verem_Savasi_2017_Raporu.pdf) (Erişim: Aralık 2018).
6. Shaw JA, Irusen EM, Diacon AH, Koegelenberg CF. Pleural tuberculosis: A concise clinical review. *Clin Resp J.* 2018;12(5):1779-86. <https://doi.org/10.1111/crj.12900>
  7. Zhai K, Lu Y, Huan-Zhong S. Tuberculous pleural effusion. *J Thorac Dis.* 2016;8(7):E486-94. <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.05.87>
  8. Cohen LA, Light RW. Tuberculous pleural effusion. *Turk Thorac J.* 2015;16(1):1-9. <https://doi.org/10.5152/ttd.2014.001>
  9. Trajman A, Pai M, Dheda K, et al. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur Respir J.* 2008;31(5):1098-106. <https://doi.org/10.1183/09031936.00147507>
  10. Vorster MJ, Allwood BW, Diacon AH, Koegelenberg CF. Tuberculous pleural effusions: advances and controversies. *J Thorac Dis.* 2015;7(6):981-91. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.18>
  11. Soolingen DV, Jarlier V, Drobniewski F. Information for physicians: The laboratory diagnosis of tuberculosis-first steps. In: *Mastering the Basics of TB Control: Development of a Handbook on TB Diagnostic Methods.* Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report. 2011, p. 96-9. [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105\\_TER\\_Basics\\_TB\\_control.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf) (Erişim: Aralık 2018)
  12. Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* Vol. 2, ASM Press, Washington, ABD, 2004.
  13. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*, Tentative standard M24-T, Wayne, PA, ABD, 1995.
  14. Khan AH, Sulaiman AZ, Muttalif AR, et al. Pleural tuberculosis and its treatment outcomes. *Trop J Pharm Res.* 2013;12(4):623-7. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i4.27>
  15. Erbaş M, Karapolat S, Dumlu T, Gezer S, Karapolat B. Tüberküloz plörezi ve video yardımcı torakoskopik cerrahi. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2011;1(3): 27-30.
  16. Ferrer J. Pleural tuberculosis. *Eur Respir J.* 1997;10(4): 942-7. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.1004094>
  17. Gopi A, Madhavan SM, Sarma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest.* 2007;131(3):880-9. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2063>
  18. Marjani M, Yousefzadeh A, Tabarsi P, Moniri A, Velayati AA. Yield of mycobacteriological study in diagnosis of pleural tuberculosis among Human immune deficiency virus-infected patients. *Int J Mycobacteriol.* 2016;(5 Suppl 1):S112-3. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.09.043>
  19. Mihmanlı A, Özşeker F, Baran A, Küçükler F, Atik S, Akkaya E. Tüberküloz plörezi 105 olgunun değerlendirilmesi. *Tüberküloz Toraks.* 2004;52(2):137-44.
  20. Valdés L, Alvarez D, San José E, et al. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med.* 1998;158(18):2017-21. <https://doi.org/10.1001/archinte.158.18.2017>
  21. Asan E, Kırbaş G, Özekinci T, ve ark. Tüberküloz plörezi pleural doku kültürünün tanı değeri. *Solunum Hastalıkları.* 2001;12(4):279-83.
  22. Diacon AH, Van de Wal BW, Wyser C, et al. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *Eur Respir J.* 2003;22(4):589-91. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00017103a>
  23. Ruan SY, Chuang YC, Wang YJ, et al. Revisiting tuberculous pleurisy: pleural fluid characteristics and diagnostic yield of mycobacterial culture in an endemic area. *Thorax.* 2012;67(9):822-7. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-201363>
  24. Kısa Ö, Tozkoparan E, Gümrall R, Deniz Ö, Albay A, Baylan O. Tüberküloz plörezi tanısında mikrobiyolojik kültür yöntemlerinin değeri: 283 olgunun analiz. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2005;35(2):114-8.
  25. Yalçın YA, Erer OF, Biçmen C, Özkan SA. Tüberküloza bağlı plevra sıvılarının yatakbaşı BACTEC sıvı besiyerine inokulasyonunun tanısallığı. *Toraks Derg.* 2005;6(1):37-43.
  26. Porcel JM. Advances in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Ann Transl Med.* 2016;4(15):282. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.07.23>
  27. Babalik A, Kiziltas S, Oruc K, Cetintas G, Altunbey S, Calisir CH. The profile of pleural tuberculosis patients in Turkey. *Med Sci.* 2013;2(1):374-85. <https://doi.org/10.5455/medscience.2012.01.8038>
  28. Ceylan E, Özbay B, Uzun K, Gencer M, Gülsün A, Zehir İ. 125 Plörezi olgunun incelenmesi. *Van Tıp Derg.* 1998;5(4):225-31.
  29. Ekinci GH, Hacıömeroğlu O, Özel Y, Işık AC, Arıtan B, Yılmaz A. Tüberküloz plörezi 50 olgunun değerlendirilmesi. *Maltepe Tıp Derg.* 2015;7(3):1-5.
  30. Ak G, Alataş F, Metintaş M, ve ark. Tüberküloz plörezi olguların genel özellikleri. *Toraks.* 2002;3(1):45-51.
  31. Kömürçüoğlu A, Kıraklı C, Polat G, Meral AR, Utkaner G, Tibet G. Tüberküloz plörezi 185 olgunun analizi. *Akciğer Arşivi.* 2003;4(1):21-6.
  32. Yurdakul AS, Çalışır HC, Taci N, Öğretensoy M. Tüberküloz plörezi olgularının özellikleri. *Solunum*

- Hastalıkları. 2002;13(1):30-6.
33. WHO. World Health Organization. Treatment of tuberculosis-guidelines for national programmes, Fourth Edition. 2010:3-5.
  34. Baumann MH, Nolan R, Petrini M, Lee YC, Light RW, Schneider E. Pleural tuberculosis in the United States: incidence and drug resistance. *Chest*. 2007;131(4):1125-32.  
<https://doi.org/10.1378/chest.06-2352>
  35. Shu CC, Wang JT, Wang JY, Lee LN, Yu CJ. In-hospital outcome of patients with culture-confirmed tuberculous pleurisy: clinical impact of pulmonary involvement. *BMC Infect Dis*. 2011;11:46  
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-46>
  36. Chan CH, Arnold M, Chan CY, Mak TW, Hoheisel GB. Clinical and pathological features of tuberculous pleural effusion and its long-term consequences. *Respiration*. 1991;58(3-4):171-5.  
<https://doi.org/10.1159/000195921>
  37. Aktoğu S, Yorgancıoğlu A, Cirak K, Köse T, Dereli SM. Clinical spectrum of pulmonary and pleural tuberculosis: a report of 5,480 cases. *Eur Respir J*. 1996;9(10):2031-5.
  38. Soe Z, Shwe WH, Moe S. A study on tuberculous pleural effusion. *Int J Collab Res Intern Med Public Health*. 2010;2(3):32-48.
  39. Uçar ZZ, Çakan A, Dereli F, Özsöz A, Soy Ö. Investigation of the parenchymal lesion frequency in tuberculous pleurisy cases by thorax high resolution computerized tomography. *Eurasian J Pulmonol*. 2002;4(4):437-42.
  40. Brogi E, Gargani L, Bignami E, et al. Thoracic ultrasound for pleural effusion in the intensive care unit: a narrative review from diagnosis to treatment. *Crit Care*. 2017;21(1):325.  
<https://doi.org/10.1186/s13054-017-1897-5>
  41. Karkhanis VS, Joshi MJ. Pleural effusion: diagnosis, treatment, and management. *Open Access Emerg Med*. 2012;4:31-52.  
<https://doi.org/10.2147/OAEM.S29942>
  42. Yang W, Zhang B, Zhang ZM. Infectious pleural effusion status and treatment progress. *J Thorac Dis*. 2017;9(11):4690-9.  
<https://doi.org/10.21037/jtd.2017.10.96>
  43. Robinson BWS, Musk AW. Benign asbestos pleural effusion: diagnosis and course. *Thorax*. 1981;36:896-900.
  44. Çetinkaya PD. Tüberküloz plörezi tanı yöntemleri. *TTD Plevra Bülteni*. 2010;4(2):5-9.
  45. Kim HJ, Lee HJ, Kwon SY, et al. The prevalence of pulmonary parenchymal tuberculosis in patients with tuberculous pleuritis. *Chest*. 2006;129(5):1253-8.  
<https://doi.org/10.1378/chest.129.5.1253>

# **Geobacillus toebii HBB-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Konserve Gıdalarda *Bacillus coagulans* ve *Geobacillus stearothermophilus*'u Engellemek Amacıyla Uygulanması<sup>§</sup>**

## *The Use of Bacteriocin Produced by Geobacillus toebii HBB 218 to Prevent the Growth of Bacillus coagulans and Geobacillus stearothermophilus in Canned Food*

Ayşe Alkış Ceylan\*,\*\*<sup>Ⓞ</sup>, Gamze Başbülbul\*,\*\*<sup>Ⓞ</sup>

\*Aydın Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın

\*\*Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi, REDPROM, Aydın

### Öz

**Amaç:** Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen ve üreticiye yakın akraba türlerin gelişmesinde engelleyici bir etki gösteren protein yapıda bileşiklerdir. Son yıllarda, termofilik bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, termostabil olmaları nedeniyle ısı işlem görmüş gıdaların korunmasında dikkat çekmiştir. Bu çalışmada, *Geobacillus toebii* HBB-218 suşu tarafından üretilen ve toebisin 218 olarak adlandırılan bakteriyosinin konserve gıdalarda *Bacillus coagulans* DSM 1 ve *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22'nin gelişimine karşı etkisi incelenmiştir.

**Yöntem:** Bakteriyosin üreticisi olan *Geobacillus toebii* HBB-218 bakterisi sıvı besiyerinde inkübe edilmiş ve hücresiz kültür sıvıları liofilize edilerek aktivite hesaplanmıştır. Toebisin 218 olarak adlandırılan bakteriyosin, konserve mısır, konserve bezelye ve salçaya inoküle edilen indikatör bakterilerin vejetatif hücreleri ve endosporları üzerinde test edilmiştir. İndikatör bakteri olarak *B. coagulans* DSM 1 ve *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 kullanılmıştır. Farklı zaman aralıklarında gıda örneklerinden canlı hücre sayımları yapılmış ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.

**Bulgular:** *B. coagulans* DSM 1 ve *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22'nin vejetatif hücreleri ile yapılan deney düzenleğinde liofilize edilmiş bakteriyosin bakteri hücre sayısında kademeli bir azalmaya neden olmuştur. Yirmi dört saat sonunda ise canlı bakteri hücrelerine rastlanmamıştır. Aynı işlem, söz konusu bakterilerin endosporları ile de denenmiştir. Endosporlarla kurulan deney düzeneklerinde, sayım sonuçları incelendiğinde, üremenin 2-7 veya 7-15 günler arasında sonlandığı görülmüştür.

**Sonuç:** Çalışmanın sonuçlarına göre, Toebicin 218'in, konserve yiyeceklerde *G. stearothermophilus* ve *Bacillus coagulans*'a karşı biyokoruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Bakteriyosin, *Geobacillus toebii*, konserve gıda, termofilik

### ABSTRACT

**Objective:** Bacteriocins are proteinaceous compounds produced by bacteria and have an inhibitory effect on the development of closely related species. In recent years, bacteriocins produced by thermophilic bacteria have attracted much attention because of their thermostability which is important for protection of heat-processed food. In this study, a bacteriocin, which is tentatively named as toebicin 218 produced by *Geobacillus toebii* strain HBB-218 was used against the growth of *Bacillus coagulans* DSM 1 and *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 in canned food.

**Methods:** As bacteriocin producer *Geobacillus toebii* HBB-218 was incubated in liquid medium. After incubation cell-free culture supernatants were lyophilized to estimate activity of bacteriocin in supernatants. Toebicin 218 was tested on vegetative cells and endospores of indicator bacteria inoculated into canned corn, canned pea and tomato paste. *B. coagulans* DSM 1 and *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 were used as indicator bacteria. Viable bacterial cells of food samples were counted at different time intervals and compared with control plates.

**Results:** In the experimentl performed using vegetative cells of *B. coagulans* DSM 1 and *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22, lyophilised bacteriocin induced a gradual decrease in bacterial cell counts. After 24 hours, any viable cell was not observed. The same procedure was also tested with endospores of the bacteria in question. In the experimental set ups established with endospores, when the bacterial counts were examined it was seen bacterial growth was terminated within 2-7 or 7-15 days.

**Conclusion:** According to the results of the study, Toebicin 218 has a potential to be used as a biopreservative in canned food against *G. stearothermophilus* and *B. coagulans*.

**Keywords:** Bacteriocin, *Geobacillus toebii*, canned food, thermophilic

Alındığı tarih:

13.02.2019

Kabul tarihi:

27.05.2019

Yayın tarihi:

30.09.2019

ORCID Kayıtları

A. Alkış Ceylan 0000-0002-9226-2715

G. Başbülbul 0000-0001-8151-6321

✉ gbasbulbul@adu.edu.tr

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

## GİRİŞ

Gıdaların korunması, tüketici sağlığına zarar veren veya ekonomik kayıplara neden olan mikroorganizmalar nedeniyle sürekli gündemde olan bir konudur. Gıdaların korunması ve raf ömürlerinin uzatılmasında kullanılan birtakım yöntemler bulunmaktadır. Çeşitli paketlenme yöntemleri, ısı işlemler, dondurarak kurutma/soğutma, bakteriyosinler gibi antimikrobiyal katkıları bu yöntemlerin arasında yer almaktadır<sup>(1)</sup>.

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein özelliğinde ve antagonistik etki gösteren bileşiklerdir. Üretici türe yakın akraba türlere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki modu ile dar veya geniş bir aktivite spektrumu gösterirler. Tüketicilerin taze, besleyici ve kimyasal madde içermeyen yiyeceklere olan talebi, bakteriyosinleri, gıda endüstrisi için doğal bir biyokoruyucu hâline getirmektedir. Literatürde, mezofilik bakteri gruplarından uzun yıllardır birçok bakteriyosin rapor edilmiş olmasına rağmen<sup>(3-10)</sup>, *Geobacillus* suşlarında çalışılan bakteriyosinlerin çoğu yakın zamanlarda çalışılmaya başlamıştır<sup>(11-18)</sup>.

*Bacillus coagulans* ve *Geobacillus. stearothermophilus* (eski adı *Bacillus stearothermophilus*) Gram pozitif endospor oluşturan bakterilerdir, asit ve asitlenmiş gıdalarda "ekşime" tarzında bozulmaya neden olabilirler<sup>(19,20)</sup>. *B. coagulans* endosporlarının konserve meyve ve domates ürünlerinde 4.1-5.0 pH arasında çimlenebileceği rapor edilmiştir<sup>(21)</sup>. Yüksek sıcaklığa dayanıklı *G. stearothermophilus* sporları, özellikle tropik iklimlerde düşük asitli konserve yiyeceklerde ekşime tarzı bozulmalardan sorumludur.

Bu çalışmada, çeşitli konserve gıdalarda toebisin 218'in *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1'in vejetatif hücrelerine ve endosporlarına karşı inhibe edici etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Edindiğimiz bilgilere göre, bu çalışma *Geobacillus toebii* suşundan bir bakteriyosinin gıdalar üzerindeki etkisinin test edildiği ilk çalışmadır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Bakteri suşları ve büyüme koşulları:** Toebisin 218 üreticisi *G. toebii* HBB-218 suşu topraktan izole edilmiş ve 16S rDNA analizi ile tanımlanmıştır<sup>(15)</sup>. *G. stearothermophilus* DSM-22 (tip suş) ve *B. coagulans* DSM-1 Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonundan elde edilmiştir (DSMZ, Braunschweig, Almanya). *G. toebii* HBB-218, 55°C'de beyin-kalp infüzyon (BHI) buyyon ortamında geliştirilmiştir. *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1, sırasıyla 45°C ve 37°C'de triptik soy agar (TSA)'da rutin olarak büyütülmüştür.

**Gıda örnekleri:** Konserve mısır (pH 6.6), konserve bezelye (pH 6.4) ve konserve domates salçası (pH 4.4), Aydın'daki marketlerden sağlanmıştır. İnokülüm için mısır ve bezelye konservelerinin sıvı fraksiyonları kullanılmıştır. Örnekler aseptik olarak açılmış ve aynı anda bakteriler ile inokule edilmiştir.

**Bakteriyosin preparatının hazırlanması:** *G. toebii* HBB-218, BHI buyyon besiyerinde 55 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 8.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve 0.20 µl por çaplı steril membran filtreden süzölmüştür. Hücesiz kültür süpernatantları (CFS) -50°C'de 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir (Freezone 6, Model 77520; Labconco Co. Kansas City, MO, ABD). Liyofilize preparat, steril distile su içinde % 0.1 konsantrasyonda hazırlanarak indikatör bakteri *G. stearothermophilus* DSM-22'ye karşı bakteriyosin aktivitesi belirlenmiştir<sup>(22)</sup>. Aktivite AU/mL= d x (1.000 / 50) (d En son zon görülen seyreltme) formülüne göre hesaplanmıştır (Resim 1).

**İnokülüm ve endospor süspansiyonlarının hazırlanması:** *G. stearothermophilus* DSMZ-22'nin üssel fazındaki vejetatif hücreleri yiyecek ve içeceklere inoküle edilmeden önce TSB'da 45°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. *B. coagulans* DSM 1, TSB'da 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Endospor preparatları için ise TSA besiyerlerine *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1 stok kültürlerinden swab ile

ekim yapılarak *G. stearothermophilus* DSM-22, 20-25 gün 45°C'de, *B. coagulans* DSM-1 37°C'de 4-5 gün inkübe edilmiştir. Endospor konsantrasyonu mikroskop altında incelenip %90 seviyesine ulaştığında petrilere steril distile su eklenerek kültürler tüplere toplanmış ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra, süpernatantlar atılarak pellet üç kez yıkanmıştır. Son olarak, pellet steril distile suda çözülerek daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır<sup>(19,23)</sup>.

**Deney düzeneklerinin kurulması:** Gıda örnekleri, bir sette logaritmik gelişme fazındaki, 14 saatlik *G. stearothermophilus* DSM-22 (1 mL) hücreleri ve diğer sette logaritmik fazdaki 12 saatlik *B. coagulans* DSM-1 (1 mL) hücreleri ile inoküle edilmiştir. Teobicin 218 (1280 AU/mL) tek başına veya %1.5 laktik asit çözeltisi ile kombinasyonlar halinde örnekler eklenmiştir. Kontrol grubundaki bütün tüpler, *G. stearothermophilus* DSM-22 için 45°C'de ve *B. coagulans* DSM-1 için 37°C'de inkübe edilmiştir. Aynı prosedür, *G. stearothermophilus* DSM-22 ve *B. coagulans* DSM-1 endosporları için daha önce belirtildiği gibi hazırlanan endospor süspansiyonları ( $3 \times 10^6$  cfu/mL) kullanılarak uygulanmıştır. Örnekler periyodik olarak alınıp, homojenize edilmiş ve ardışık seyreltilerek üç tekrarlı olarak koloni sayımı için TSA petrilere yayılmıştır. Canlı hücre sayısı, cfu/mL ya da cfu/g olarak belirtilmiştir ve sayım için belirlenen alt limit 10 CFU'dur.

## BULGULAR

**Toebicin 218'in gıda örneklerinde vejetatif *G. stearothermophilus* DSM-22 hücreleri üzerindeki etkisi:** Toebicin 218 ilave edilmiş konserve mısır, konserve bezelye ve domates salçası örneklerinde, canlı hücre sayısı 2-4 saat içerisinde gittikçe azalmıştır. Konserve mısır, konserve bezelye ve domates salçası örneklerinde, sırasıyla 1.8, 1.5 ve 1.7 log birim azalmalar belirlenmiştir. Toebicin 218 laktik asit kombinasyonu ile test edildiğinde kısmen farklı sayımlar gözlenmiş; mısır, bezelye ve domates salçası örneklerinde 4 saatlik inkübasyon sonunda canlı hücre sayısında sırasıyla 1.5, 1.6 ve 1.7 log birim azalmalar görülmüştür. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda ise, kontrol grubu haricindeki düzeneklerde canlı hücre belirlenememiştir (Tablo 1).

**Toebicin 218'in gıda örneklerinde *G. stearothermophilus* DSM-22 endosporları üzerindeki etkisi:** Toebicin 218'in *G. stearothermophilus* DSM-22 endosporları üzerindeki etkisini test etmek için örnekler inkübasyonun belirli aralıklarında (0, 1, 2 ve 7 gün) alınmış ve canlı hücre sayımı yapılmıştır. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonunda yalnızca Toebicin 218 eklenmiş tüplerde kontrol grubuna göre mısır, bezelye ve salçada sırasıyla 1.8, 1.5 ve 0.8 log azalma görülmüştür. Toebicin 218 ve laktik asitin birlikte eklendiği mısır, bezelye ve salça örneklerinde ise sırasıyla 1.7, 1.6 ve 0.8 log birimlik azalma tespit edilmiştir. Bir haftalık inkübasyon sonrasında, test edilen örneklerde, kontrol grubu haricinde, canlı hücreye rastlanmamıştır (Tablo 2).

**Tablo 1.** Toebicin 218 ve Toebicin 218+laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Geobacillus stearothermophilus* DSM-22'nin vejetatif hücreleri üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.06	5.03±0.06	5.03±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06
2	5.03±0.01	4.48±0.12	4.79±0.00	5.02±0.03	3.56±0.10	3.69±0.02	3.55±0.15	3.24±0.18	3.13±0.06
4	4.98±0.01	3.25±0.00	3.48±0.13	5.02±0.02	2.96±0.04	3.42±0.10	4.40±0.02	2.70±0.12	2.63±0.11
24	5.56 ±0.04	ND*	ND*	5.41±0.29	ND*	ND*	3.57±0.29	ND*	ND*

\*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

**Tablo 2. Toebicin 218 ve Toebicin 218 + laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Bacillus coagulans* DSM1'in vejetatif hücreleri üzerine etkisi.**

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	4.74±0.00	4.74±0.00	4.74±0.00	5.17±0.07	5.17±0.07	5.17±0.07	4.02±0.18	4.02±0.18	4.02±0.18
2	4.86±0.06	3.06±0.03	3.17±0.07	4.76±0.14	3.24±0.00	3.13±0.1	4.08±0.08	3.23±0.40	3.3±0.20
4	4.78±0.02	2.63±0.01	2.83±0.17	4.72±0.05	2.70±0.06	2.63±0.05	4.4±0.18	2.28±0.16	2.35±0.62
24	4.87±0.20	ND*	ND*	5.53±0.00	ND*	ND*	2.71±0.27	ND*	ND*

\*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

**Tablo 3. Toebicin 218 ve Toebicin 218 + laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Geobacillus stearothermophilus* DSM-22 endosporları üzerine etkisi.**

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.03	5.03±0.06	5.03±0.06	5.03±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06	4.41±0.06
2	5.03±0.01	4.48±0.12	4.79±0.00	5.02±0.03	3.56±0.10	3.69±0.02	3.55±0.15	3.24±0.18	3.13±0.06
4	4.98±0.01	3.25±0.00	3.48±0.13	5.02±0.02	2.96±0.04	3.42±0.10	4.40±0.02	2.70±0.12	2.63±0.11
24	5.56 ±0.04	ND*	ND*	5.41±0.29	ND*	ND*	3.57±0.29	ND*	ND*

\*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

**Tablo 4. Toebicin 218 ve Toebicin 218 + laktik asit kombinasyonunun farklı gıda örneklerinde *Bacillus koagulans* DSM-1 endosporları üzerine etkisi.**

İnkübasyon süresi (günler)	Canlı hücre sayısı								
	Konserve mısır			Konserve bezelye			Domates salçası		
	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit	Kontrol	Toebicin 218	Toebicin 218 + laktik asit
0	5.76±0.03	5.76±0.03	5.76±0.03	5.3±0.09	5.3±0.09	5.3±0.09	5.56±0.07	5.56±0.07	5.56±0.07
1	5.76±0.11	4.41±0.25	4.5±0.01	5.71±0.01	3.68±0.22	3.39±0.06	5.19±0.16	2.27±0.01	2.23±0.12
2	4.68±0.06	3.65±0.01	3.45±0.15	5.17±0.08	2.75±0.01	2.63±0.14	2.71±0.14	2.01±0.15	2.21±0.20
7	4.57±0.12	ND*	ND*	4.52±0.03	ND*	ND*	2.21±0.05	1.73±0.04	1.86±0.12
15	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	2.5±0.30	ND*	ND*

\*Plaklarda canlı hücre sayılmamıştır.

**Toebicin 218'in gıda örneklerinde vejetatif *B. coagulans* hücreleri üzerindeki etkisi:** Toebicin 218'in *B. coagulans* DSM1 üzerindeki etkisine bakıldığında, mısır, bezelye ve salça örneklerinde 4 saat içinde sırasıyla canlı hücre sayılarının 2.1, 2.5, 1.7 log birim azaldığı görülmüştür. Dört saat sonra laktik asit takviyeli örneklerde benzer sonuçlar gözlenmiştir. Yirmi dört saatlik inkübasyonun sonunda, kontrol

dışında test edilen tüm gıda numunelerinde koloni sayılarının limit seviyesinin altında olduğu görülmüştür (Tablo 3).

**Toebicin 218'in gıda örneklerinde *B. coagulans* endosporları üzerindeki etkisi:** Toebicin 218'in tek başına *B. coagulans* endosporlarına karşı test edilmesi sonucunda mısır, bezelye ve salça örneklerindeki

koloni sayımlarında sırasıyla 2.1, 2.6, ve 3.6 log birimlik düşüş gözlenmiştir. Örneklere uygulanan laktik asit takviyesi benzer seviyedeki canlı hücre sayılarını 2.3, 2.7, 3.4 log birim kadar düşürmüştür. Konserve mısır ve konserve bezelye için 7 günlük inkübasyonun sonunda canlı hücreye rastlanmazken, domates salçasında bir hafta inkübasyon sonunda kontrol grubunda hala canlı bakteri olduğu belirlenmiştir (Tablo 4).



Resim 1. Toebicin 218'in *Geobacillus stearothermophilus*'a karşı aktivitesi.

## TARTIŞMA

Yaptığımız çalışma sonucunda, Toebicin 218'in gıdalarda bulunan her iki bakterinin büyümesine karşı etkili olduğu bulunmuştur. Vejetatif hücre ilaveli deney düzeneklerinde 24 saat içinde tamamen inaktivasyon gözlenirken, endospor içeren gıdalarda 2-7 veya 7-15 gün arasında canlı hücre sayımı, limit seviyenin altında kalmıştır.

Laktik asit, antimikrobiyal özelliğe sahip bir organik asittir ve genellikle düşük pH seviyelerinde bakteriyosinin net yükünü artırabilmesi nedeniyle bakteriyosinlerle birlikte kullanılır. Böylece laktik asit, bakteriyosinin hücre çeperi içinden translokasyonunu kolaylaştırır ayrıca bakteriyosinin çözünürlüğünü artırır<sup>(23)</sup>. Ancak çalışmamızda, laktik asit takviyesinin *G. stearothermophilus* endosporları dışında belirgin bir mikrobiyal inaktivasyon etkisi yoktur. Yirmi

dört saatlik inkübasyonun sonunda, vejetatif bakteri hücreleri ile inoküle edilen örneklerde canlı hücreler gözlenmezken, endosporlarla kontamine olmuş gıda numunelerinde hâlâ yaşamda kalan hücreler mevcuttur. Bu durum, Toebicin 218'in vejetatif hücre membranlarında por oluşturma etkisi ile açıklanabilir (yayınlanmamış veri). Bakteriyel endosporlar vejetatif hücrelerle karşılaştırıldığında birkaç istisna dışında bakteriyosin uygulamasına karşı daha dirençlidir<sup>(24-26)</sup>. Çalışmamızda, endospor inoküle edilen örneklerde hücre sayısında (en az 2.1 log ünite - en fazla 3.2 log ünite) güçlü azalma gözlenmiştir. Ayrıca *G. stearothermophilus* endosporlarının, konserve bezelye ve mısır örneklerinde hücre sayısında daha yüksek azalma seviyeleri ile bakteriyosin uygulamasına daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Viedma ve ark.<sup>(19)</sup>, 2009 konserve ve hindistancevizi sütlerinde *G. stearothermophilus*'a karşı test edilen Enterocin AS-48 için de benzer sonuçlar bildirmiştir. Araştırmacılar, hindistancevizi sütündeki bakteri inaktivasyonunun vejetatif hücreler için endosporlardan daha hızlı olduğunu bulmuşlardır. Enterocin AS-48 aynı zamanda *B. coagulans*'ın vejetatif hücreleri ve endosporlarına karşı konserve meyve ve bitkisel gıdalarda da test edilmiştir. *B. coagulans* hücreleri domates salçasında 37°C'de 24 saat içinde 3 log birim azalmış ve 15 günlük inkübasyonun sonunda hiçbir canlı hücre gözlenmemiştir. Çalışmamızda domates salçası ile kurulan deney düzeneklerinin kontrol gruplarında hücre sayısı azalırken konserve bezelye ve mısırdaki hafif bir artış yaşanmıştır. Bu durum domates salçasında kullanılan bazı kimyasal maddeler veya katkı maddeleri ile ilgili olabilir.

Başka bir çalışmada, enterocin EJ97, hindistan cevizi sütü, konserve bezelye ve mısır, hindistan cevizi suyunda *G. stearothermophilus* CECT48 ve CECT 49 suşlarına karşı test edilmiştir. Otuz günlük inkübasyonun sonunda canlı hücre sayılarının limit seviyelerinin altında olduğu belirlendi ve araştırmacılar, mikrobiyal inaktivasyondaki değişikliklerin bakteriyosin konsantrasyonuna ve kullanılan gıdanın türüne bağlı olduğunu belirtmişlerdir<sup>(20)</sup>. Enterocin EJ97 aynı zamanda *B. coagulans*'a karşı konserve mısır ve

bezelye sıvılarında EDTA içeren veya içermeyen polietilen paketlemede kullanılmıştır. Mikroskopik incelemelere göre, bakteri ve EDTA ile muamele edilmiş örneklerde 24 saatlik inkübasyon sonunda ölü hücre seviyesinin %97 olduğu bulunmuştur<sup>(27)</sup>.

Bu çalışmada, Toebicin 218'in konserve gıda örneklerinde hem *G. stearothermophilus* hem de *B. coagulans*'ın vejetatif hücrelerinin ve endosporlarının gelişimini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu özelliklerinden dolayı, Toebicin 218 bakteriyosini konserve gıda ürünlerinde bozulmaya neden olan ve endospor oluşturan bakterileri inhibe etmek için güvenli bir biyolojik koruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından verilen bir proje ile (ADU-FEF 15012) desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Mogoşanu GD, Grumezescu AM, Bejenaru C, Bejenaru LE. Natural products used for food preservation. In: Grumezescu AM: Food Preservation, Academic Press, Elsevier, 2017:365-411.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804303-5.00011-0>  
<https://doi.org/10.1016/C2015-0-01051-6>
2. O'sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. 2002;84(5-6):593-604.  
[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01457-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8)
3. Stein T, Düsterhus S, Stroh A, Entian KD. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(4):2349-53.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2349-2353.2004>
4. Aymerich T, Garriga M, Jofré A, Martin B, Monfort JM. The use of bacteriocins against meat-borne pathogens. In: Nolle LML, Toldra F (eds.) *Advanced Technologies for Meat Processing*, London, CRC Press, New York, Marcel Dekker, 2006; 401-18.  
<https://doi.org/10.1201/9781420017311.ch15>
5. Jofré A, Aymerich T, Garriga M. Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* sp. in cooked ham. *Food Control*. 2008;19(6):634-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.007>
6. Randazzo CL, Pitino I, Scifò GO, Caggia C. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*. 2009;20(8):756-63.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.020>
7. Nieto-Lozano JC, Reguera-Useros JI, Peláez-Martínez MDC, Sacristán-Pérez-Minayo G, Gutiérrez-Fernández AJ, de la Torre AH. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*. 2010;21(5):679-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.007>
8. Grande Burgos MJ, Pulido RP, del Carmen López Aguayo M, Gálvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):22706-27.  
<https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
9. Makhmal S, Kanawjia SK, Giri A. Effect of microGARD on keeping quality of direct acidified Cottage cheese. *J Food Sci Technol*. 2015;52(2):936-43.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1055-2>
10. Goñi MG, Tomadoni B, Audisio MC, Ibarra C, Roura SI, Moreira MR, Ponce AG. Application of bacteriocins from *Enterococcus hirae* on butterhead lettuce seeds inoculated with *Escherichia coli* O157:H7. *Int Food Res J*. 2016;23(6):2653-60.
11. Yule R, Barridge BD. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus* strain NU-10. *Can J Microbiol*. 1976;22(12):1743-50.  
<https://doi.org/10.1139/m76-257>
12. Sharp RJ, Bingham AHA, Comer MJ, and Atkinson A. Partial characterization of a bacteriocin (thermocin) from *Bacillus stearothermophilus* RS93. *Microbiology*. 1979;111(2):449-51.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-111-2-449>
13. Novotny JF, Perry JJ. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(8):2393-6.
14. Pokusaeva K, Kuisiense N, Jasinskyte D, Rutiene K, Saleikiene J, Chitavichius D. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. *Cent Eur J Biol*. 2009;4(2):196-203.  
<https://doi.org/10.2478/s11535-009-0009-1>
15. Başbülül Özdemir G, Biyik HH. Isolation and characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Geobacillus toebii* strain HBB-247. *Indian J Microbiol*. 2012;52(1):104-8.

- <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0227-x>
16. Başbülbül Özdemir G, Biyik HH. Isolation and characterization of toebicin 218, a bacteriocin, produced by *Geobacillus toebii* HBB-218. *Afr J Biotechnol.* 2012;11(30):7711-9. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1331>
  17. Garg N, Tang W, Goto Y, Nair SK, Van Der Donk WA. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5241-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116815109>
  18. Pranckute R, Kaunietis A, Kananaviciute R, Lebedeva J, Kuisiene N, Saleikiene J, Citavicius D. Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2015;5(2):155-61. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.5.2.155-161>
  19. Viedma PM, Abriouel H, Omar NB, López RL, Valdivia E, Gálvez A. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. *Food Microbiol.* 2009;26(3):289-93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.007>
  20. Viedma PM, Abriouel H, Omar NB, López RL, Gálvez A. Effect of enterocin EJ97 against *Geobacillus stearothermophilus* vegetative cells and endospores in canned foods and beverages. *Eur Food Res Technol.* 2010;230(3):513-9. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1194-x>
  21. Brackett RE. Fruits, vegetables, and grains. In: Doyle M, Beuchat LR, Montville TJ (Eds.), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers.* ASM Press, Washington, 2001:127-38.
  22. Abriouel H, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M, Gálvez A. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J Microbiol Method.* 2003;55(3):599-605. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00202-1)
  23. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(1-2):51-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
  24. Abriouel H, Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Valdivia E. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):1473-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1473-1477.2002>
  25. Grande MJ, Lucas R, Abriouel H, et al. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int J Food Microbiol.* 2005;104(3):289-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.010>
  26. Lucas R, Grande MJ, Abriouel H, et al. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem Toxicol.* 2006;44(10):1774-81. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.05.019>
  27. Viedma PM, Ercolini D, Ferrocino I, et al. Effect of polythene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. *LWT-Food Sci Technol.* 2010;43(3):514-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.020>

## Çeşitli Postmortem Örneklerden İzole Edilen Maya Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları

### *The Distribution of Species and Antifungal Susceptibilities of Yeasts Isolated from Various Postmortem Samples*

Nihan Ziyade\*<sup>©</sup>, Neval Elgörmüş\*<sup>©</sup>, Murat Nihat Arslan\*\*<sup>©</sup>

\*İstanbul Adli Tıp Kurumu, Postmortem Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

\*\*İstanbul Adli Tıp Kurumu, Otopsi Şubesi, İstanbul

#### ÖZ

**Amaç:** *Candida* türlerinin neden olduğu mantar enfeksiyonları, immun sistemi baskılanmış hastalarda özellikle yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalmayı gerektiren durumlarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Çalışmamızda, çeşitli postmortem örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tür dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya, 2014-2018 yılları arasında, otopsi yapılan olgulardan postmortem mikrobiyoloji laboratuvarına inceleme için gönderilen 71 olgunun çeşitli örneklerinden üreyen 176 maya türü dahil edilmiş ve retrospektif olarak incelenmiştir. İzole edilen maya türleri koloni morfolojisi, Gram boyanma özellikleri, germ tüp testi ve VITEK 2 Compact® (bioMérieux, Fransa) otomatize tanımlama sistemi ile tiplendirilmiş, antifungal duyarlılıkları VITEK 2 Compact® sistemi ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Toplam 176 maya izolatının 87'si *Candida albicans* (%49.4), 36'sı *Candida tropicalis* (%20.5), 30'u *Candida glabrata* (%17), 8'i *Candida parapsilosis* (%4.5), 6'sı *Candida kefir* (%3.4), 5'i *Candida krusei* (%2.8), ikisi *Candida dubliniensis* (%1.2), ikisi *Cryptococcus neoformans* (%1.2) olarak tanımlanmıştır. İzolatların flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve mikafungin için elde edilen direnç oranları sırasıyla %10.2, %4.1, %0 ve %100 olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Adli otopsilerde invazif mantar enfeksiyonu ile ilgili mikrobiyolojik araştırmalar enderdir. Bu nedenle postmortem olgulardan *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi ulusal ve uluslararası adli mikrobiyolojik çalışmalara katkıda bulunacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Candida* türleri, antifungal duyarlılık, post-mortem mikrobiyoloji

#### ABSTRACT

**Objective:** Fungal infections caused by *Candida* species are important causes of morbidity and mortality in immunocompromised patients, especially in cases requiring prolonged stay in the intensive care units. In our study, it was aimed to determine the distribution of species and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from various postmortem samples.

**Method:** Between the years 2014-2018, a total of 176 yeast species grown in various body samples of 71 autopsied cases sent to the Postmortem Microbiology Laboratory for examination were included in this retrospective study. Isolated yeast species were identified, and typed by colony morphology, Gram staining properties, germ tube test and VITEK 2 Compact® (bioMérieux, France) automated identification system. Antifungal susceptibilities were determined by VITEK 2 Compact® system.

**Results:** A total of 176 yeast isolates were identified as follows: 87 (49.4%) *Candida albicans*, 36 (20.5%) *Candida tropicalis*, 30 (17%) *Candida glabrata*, 8 (4.5%) *Candida parapsilosis*, 6 (3.4%) *Candida kefir*, 5 (2.8%) *Candida krusei*, 2 (1.2%) *Candida dubliniensis*, and 2 (1.2%) *Cryptococcus neoformans*. The resistance rates of the isolates against fluconazole, voriconazole, amphotericin B and micafungin were 10.2%, 4.1%, 0% and 100%, respectively.

**Conclusion:** Microbiological researches concerning invasive fungal infections in forensic autopsies are rarely performed. For this reason, antifungal susceptibility and species identification of *Candida* in postmortem cases will contribute to national and international forensic microbiological studies.

**Keywords:** *Candida* species, antifungal susceptibility, post-mortem microbiology

#### Alındığı tarih:

29.03.2019

#### Kabul tarihi:

20.06.2019

#### Yayın tarihi:

30.09.2019

#### ORCID Kayıtları

N. Ziyade 0000-0002-3606-0756

N. Elgörmüş 0000-0003-3472-2020

M. N. Arslan 0000-0002-9916-5109

✉ nihanziyade@gmail.com

## GİRİŞ

*Candida* enfeksiyonları; immun sistemi baskılanmış hastalar, özellikle onko hematolojik bozukluklar, solid kanser, kök hücre ya da solid organ nakli alıcıları ve yüksek dozda steroid ya da immünoşüpresif ajanların alıcıları arasında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir<sup>(1-4)</sup>. Bu hastalar risk grubu olarak değerlendirilir ve bu hasta grubunda gelişen fırsatçı mantar enfeksiyonlarının çoğunluğunda *Candida* türlerine ait patojenler izole edilmektedir<sup>(1,5,6)</sup>. Kandidemiler, tüm hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonları arasında üçüncü, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) ise dördüncü sırada yer almaktadır<sup>(7)</sup>. İnvaziv mantar enfeksiyonlarının kriptokokal menenjit ve belki de kateter ilişkili kandidemiler hariç olmak üzere ölümden önce teşhis edilmeleri çok zordur, erken tanı oranları %12-60 arasındadır<sup>(4)</sup> ve bu nedenle çoğu zaman ampirik olarak tedavi edilmektedir. Epidemiyolojileri coğrafyaya, hastane rezervuarlarına ve antifungal maruziyete göre değişiklik göstermektedir<sup>(8)</sup>.

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tedavi edilmesi güçtür, pahalı antifungal ajanlara yavaş yanıt verir, tedavilerin gecikmesi, artmış mortalite oranı ile ilişkilidir<sup>(9)</sup>. Modern tanı ve tedavi olanaklarına rağmen, bu enfeksiyonların mortalite oranları %40-60'a ulaşabilmektedir<sup>(10,11)</sup>. Erken ve uygun antifungal tedaviye başlanması *Candida* enfeksiyon mortalitesini azaltmak için son derece önemlidir. Antifungallerin ampirik tedavide daha yaygın kullanılması, dirençli mantar izolatların oluşumunu kolaylaştırmakta ve dirençli izolat oranlarında artışa neden olmaktadır. Antifungallere direnç gelişimini azaltmak, etkili antifungal tedavi uygulamak için in vitro olarak duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir<sup>(6,12)</sup>.

Çalışmamızda, çeşitli postmortem örneklerden izole edilen maya türlerinin fenotipik identifikasyonu ve mortal suşlara ait antifungal direnç profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma, Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu'nun Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Sayı:21589509/2019/125). Çalışmaya 2014-2018 yılları arasında, otopsi yapılması için gelen olgulardan postmortem mikrobiyoloji laboratuvarına inceleme için gönderilen 71 olgunun [46 erkek, 25 kadın; yaş aralığı:1-96 yıl, (median:25 yıl)] çeşitli postmortem örneklerinden izole edilen 176 maya türü dâhil edilmiştir.

İzole edilen maya türlerinden her olgunun bir izolata antifungal duyarlılık testi çalışılmıştır. İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler, Gram boyanma özellikleri, germ tüp testi ile ticari VITEK 2 Compact® (bioMérieux, Fransa) maya tanımlama sistemi kullanılmıştır. İzolatların antifungallere karşı duyarlılıkları flukonazol, vorikonazol, mikafungin ve amfoterisin-B antifungallerini içeren VITEK 2 Compact® (bioMérieux, Fransa) sistemi ile disposable VITEK 2 AST YS08 test kartları kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzlarında antifungal ajanlar için belirlenen eşik değerlere göre değerlendirilmiştir. *Candida* izolatlarının amfoterisin B'ye karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde CLSI M27-S3'te belirtilen sınır değerler kullanılırken, mikafungin, flukonazol ve vorikonazole karşı duyarlılığın belirlenmesinde CLSI M27-S4'te belirtilen türe özgü sınır değerler kullanılmıştır<sup>(13,14)</sup>. Çalışmamızda, *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 suşları kalite kontrol suşları olarak kullanılmıştır.

## BULGULAR

Adli Tıp Kurumu Postmortem Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2014-2018 yılları arasında gönderilen çeşitli postmortem örneklerin mantar kültürlerinde çeşitli maya türleri üreyen 71 olguya ait toplam 176 örnek incelenmiştir. Suşların 48'i (%27.3) kan, 22'si (%12.5) beyin omurilik sıvısı (BOS), 53'ü (%30.1) akciğer dokusu, 44'ü (%25) dalak dokusu, 3'ü (%1.7) periton sıvısı, 2'si (%1.1) batin sıvısı, 2'si (%1.1) göğüs

**Tablo 1. İzole edilen maya türlerinin dağılımı.**

Maya türü	n (%)
<i>Candida albicans</i>	87 (49.4)
<i>Candida tropicalis</i>	36 (20.5)
<i>Candida glabrata</i>	30 (17.0)
<i>Candida parapsilosis</i>	8 (4.5)
<i>Candida kefyr</i>	6 (3.4)
<i>Candida krusei</i>	5 (2.8)
<i>Candida dubliniensis</i>	2 (1.2)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2 (1.2)
Toplam	176 (100.0)

sıvısı, 1'i (%0.6) plevra sıvısı, 1'i (%0.6) de perikard sıvısı örneklerinden izole edilmiştir. Suşların izole edildiği olguların 25'i (%35.2) kadın, 46'sı (%64.8) erkek olup, yaşları 1-96 yıl (yaş ortalaması: 42.2) arasında değişmektedir.

Toplam 71 olgudan izole edilen 176 suşun 87'si *C. albicans* (%49.4), 36'sı *Candida tropicalis* (%20.5), 30'u *Candida glabrata* (%17), 8'i *C. parapsilosis* (%4.5), 6'sı *Candida kefyr* (%3.4), 5'i *Candida krusei* (%2.8), ikisi *Candida dubliniensis* (%1.2), ikisi *Cryptococcus neoformans* (%1.2) olarak tanımlanmıştır. Tüm örnek gruplarında *C. albicans* en sık izole

edilen tür olmuştur (Tablo 1). Maya türlerinin örneklerle göre dağılımı da Tablo 2'de görülmektedir.

Çalışmamızda tüm olgular için antifungal test sonuçları verilememiştir. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei* ve *C. dubliniensis* izolatları için belirlenen antifungal duyarlılık testi sonuçlarına göre vorikonazole iki adet *C. tropicalis* izolatında direnç gözlenmiştir. Amfoterisin B'ye karşı izolatların tümü hassas bulunmuştur. Flukonazol için iki adet *C. tropicalis* ve 11 *C. glabrata* izolatında direnç belirlenmiştir. Mikafungine üç adet *C. parapsilosis* izolatı az duyarlı, antifungal duyarlılık çalışılan diğer tüm izolatlar dirençli olarak belirlenmiştir. İzole edilen kandida suşlarına ait antifungal duyarlılık sonuçları Tablo 3'de gösterilmiştir. Tüm *Candida* türlerinde flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve mikafungin için elde edilen direnç oranları sırasıyla %10.2, %4.1, %0 ve %100 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda tanımlanan maya türleri arasında *C. neoformans* gibi nadir görülen türlerde bulunmaktadır. Bu olgunun AIDS hastası olduğu ve bu nedenden öldüğü belirlenmiştir. Bu olgunun antifungal duyarlılık testleri çalışmamıştır.

**Tablo 2. İzole edilen maya türlerinin postmortem örneklerle göre dağılımı [n, (%)].**

	Kan	BOS	Akciğer	Dalak	Periton sıvısı	Batın sıvısı	Plevra sıvısı	Göğüs sıvısı	Perikard sıvısı
<i>Candida albicans</i>	22 (45.8)	10 (45.5)	25 (47.2)	23 (52.3)	1 (33.3)	2 (100)	1 (100)	2 (100)	1 (100)
<i>Candida tropicalis</i>	10 (20.8)	6 (27.4)	11 (20.8)	9 (20.4)	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	9 (18.8)	3 (13.6)	10 (18.9)	7 (15.9)	1 (33.3)	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	2 (4.2)	-	3 (5.7)	3 (6.8)	-	-	-	-	-
<i>Candida kefyr</i>	2 (4.2)	2 (9)	2 (3.8)	-	-	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	2 (4.2)	1 (4.5)	1 (1.8)	-	1 (33.3)	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	-	1 (1.8)	1 (2.3)	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 (2)	-	-	1 (2.3)	-	-	-	-	-
Toplam	48	22	53	44	3	2	1	2	1

**Tablo 3. İzole edilen *Candida* suşlarının türe göre antifungal duyarlılıkları.**

Tür	Flukonazol n (%)	Vorikonazol n (%)	Amfoterisin B n (%)	Mikafungin n (%)
<i>Candida albicans</i> (n=33)	33 (100)	33 (100)	33 (100)	0 (0)
<i>Candida tropicalis</i> (n=13)	11 (84.6)	11 (84.6)	13 (100)	-
<i>Candida glabrata</i> (n=14)	3 (21.4)	-	14 (100)	0 (0)
<i>Candida parapsilosis</i> (n=3)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	0 (0)*
<i>Candida kefyr</i> (n=4)	4 (100)	-	-	-
<i>Candida krusei</i> (n=2)	-	-	2 (100)	-
<i>Candida dubliniensis</i> (n=1)	1 (100)	-	-	-

\*Üç izolat az duyarlı saptanmıştır.

## TARTIŞMA

İnvaziv mantar enfeksiyonları, özellikle YBÜ uzun süre kalmayı gerektiren durumlarda, immün sistemi baskılanmış hastalarda (kanser hastaları, organ transplantasyonu vb.) önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Mantar enfeksiyonları için risk faktörü taşıyan hastalarda en sık enfeksiyon etkeni olarak *Candida* türleri saptanmaktadır<sup>(15)</sup>. Mantar enfeksiyonlarının ölümden önce teşhis edilme olasılığı yalnızca %50 olduğundan elimizdeki mevcut epidemiyolojik bilgilerin bir kısmının doğruluğu kesin olmayabilir. Bu nedenle, otopsi raporları, yalnızca gerçek epidemiyolojiyi tanımlamak için değil, aynı zamanda invaziv mantar hastalıklarındaki araştırmanın etkinliğini kanıtlamak ve mevcut en iyi belirleyici olan ölüm öncesi tanıdaki eğilimi ele almak için değerli bir araç hâline gelmiştir<sup>(4)</sup>.

Çeşitli ülkelerden ve Türkiye'den *Candida* türlerinin dağılımı ile ilgili bildirilen çalışmalarda *C. albicans* ilk sıralarda yer almaktadır. Bir çalışmada izole edilen 2403 maya suşunun %53'ü *C. albicans*, %16'sı *C. glabrata*, %8'i *C. parapsilosis*, %8'i *C. tropicalis* olarak belirlenmiştir<sup>(16)</sup>. Pfaller ve ark.<sup>(17)</sup> en sık *C. albicans*, ikinci sırada *C. glabrata* izole etmişlerdir. Güney Kore'de yapılan bir çalışmada, 639 izolatin %38'i *C. albicans*, %26'sı *C. parapsilosis* ve %20'si *C. tropicalis* olarak bildirilmiştir<sup>(18)</sup>. Ülkemizde de Savcı ve ark.<sup>(6)</sup> 42 *Candida* izolatından; *C. albicans* %66.7, *C. glabrata* %11.9, *C. kefyr* %7.1, *C. tropicalis* %4.8, *Candida famata* %2.4, *C. krusei* %2.4, *Candida lusitanae* %2.4 ve *Candida spherica* %2.4; Kılınçel ve ark.<sup>(19)</sup> 81 *Candida* izolatından *C. albicans* %55, *C. parapsilosis* %18, *C. glabrata* %12, *C. tropicalis* %12, *Candida lipolytica* %2 ve *C. kefyr* %1; Pelit ve ark.<sup>(20)</sup> 121 *Candida* izolatından *C. albicans* %49.6, *C. tropicalis* %17.3, *C. parapsilosis* %14, *C. glabrata* %12.4 oranlarında bildirmişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kandidiyazis olgularından izole edilen kandida türlerinde değişim gözlenmekte, özellikle albicans-dışı *Candida* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlarda *C. albicans*'a göre dikkat çekici artışlar göze çarpmaktadır<sup>(21,22)</sup>. Çalışmamızda belirlenen

etkenler arasında tür dağılımına bakıldığında, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* sırası ile %49.4, %20.5, %17, %4.5 oranında tespit edilmiştir. İzole edilen kandida türlerinin yarısından fazlası albicans-dışı *Candida* izolatlarıdır. Ülkemizden bildirilen, Yapar ve ark.<sup>(23)</sup> yaptıkları çalışmada, çalışmamıza benzer olarak kandidemi etkenleri arasında sırası ile %45.8 *C. albicans*, %24.1 *C. tropicalis*, %14.5 *C. parapsilosis* ve %4.8 *C. glabrata* izolatlarını bildirirken, Hazırolan ve ark.<sup>(24)</sup>, kandidemi etkenleri arasında sıra ile %48.6 *C. albicans*, %27.02 *C. glabrata*, %13.5 *C. tropicalis* ve %8.1 *C. parapsilosis* izolatlarını bildirmişlerdir. Bu durum tüm dünyada ve ülkemizde olduğu gibi bizim olgularımızda da albicans-dışı *Candida* türlerinin giderek daha da önem kazandığını düşündürmektedir.

Postmortem olguların çeşitli dokularından elde edilen *Candida* izolatları, agonal invazyon, postmortem translokasyon ve postmortem işlemler sırasında oluşabilecek kontaminasyondan ayırt edilmelidir. Önceki çalışmalar postmortem kandideminin güvenilir bir parametre olduğunu bildirmiştir. Mantarların neden olduğu postmortem translokasyon ve agonal invazyon enderdir ve kontaminasyon oranları %4'ün altındadır<sup>(25,26)</sup>. Ölüm sonrası değerlendirme yapılması, enfeksiyon tutulumu olan organlarla ilgili bilgi sağlayabilir. Daha önce yapılan otopsi çalışmalarında akciğerin, invaziv mantar enfeksiyonlarından en çok etkilenen organ olduğu bildirilmiştir<sup>(27,28)</sup>. Çalışmamızda da akciğer (%30.1) tutulumun en yaygın olduğu organ olarak belirlenmiştir. Ayrıca, aynı izolatların dalak, akciğer ve karaciğer dokularında ve steril vücut sıvılarında tanımlanması, sistemik bir mantar enfeksiyonunun varlığını göstermektedir<sup>(29)</sup>. Bizim olgularımızın da %90'unda (64/71) birden fazla bölgede etken izole edilmiştir.

YBÜ'de uzun süre kalmayı gerektiren durumlarda, mantar enfeksiyonları ölüm nedenine katkıda bulunacaktır<sup>(30)</sup>. Bu nedenle adli otopsilerde postmortem fungal incelemeler, bu gibi durumlarda ölüm nedenini açıklamakta yararlıdır. Çalışmamızdaki olguların yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalması-

na (aralık: 1-300 gün, ortalama: 23.6 gün) dayanarak, bu risk faktörlerinin enfeksiyon oluşumunu tetiklediğine ve dolayısıyla mortaliteye katkıda bulunduğu inaniyoruz. Olgularımızdan birinde belirlenen yaygın *C. neoformans* enfeksiyonu da, altta yatan AIDS hastalığını ve yaygın mantar enfeksiyonunun olgunun ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Mayaların invaziv fungal enfeksiyondan giderek daha fazla sorumlu olduğunu ve yüksek mortalite ile ilişkili olduğunu akılda tutmak önemlidir.

Çalışmamızda, *Candida* türlerinin tanımlanması ve antifungal duyarlılık testleri için VITEK 2 Compact® (bioMérieux, Fransa) Otomatize sistemi kullanılmıştır. *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık profilleri bu sistemde, CLSI M27-S3 ve CLSI M27-S4 kılavuzunda önerilen direnç sınır değerlerine göre belirlenmiştir<sup>(13,14)</sup>.

Flukonazol, tedavi sırasında istenilen farmakolojik özelliklere sahip olması nedeniyle ilk sırada yeğlenen azoldür. Oral biyoyararlanımı yüksektir. Ancak yaygın kullanımı direnç oranlarında artışa neden olmaktadır. Ülkemizde başta *C. albicans* izolatları yer almak üzere tüm izolatlarda flukonazol direnç oranları %0-38 arasında olup, bölgelere göre değişmektedir<sup>(6)</sup>. *C. krusei* flukonazole karşı doğal dirençlidir ve flukonazolün *C. glabrata*'ya karşı etkisi sınırlıdır<sup>(31)</sup>. *Candida* suşlarında flukonazol direncini Etiz ve ark.<sup>(20)</sup> %9, Savcı ve ark.<sup>(6)</sup> *C. albicans* için %14, *C. glabrata* için %40 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda, tüm izolatlarda flukonazol direnç oranı %10.2, *C. tropicalis* izolatlarında %15.4, *C. glabrata* izolatlarında ise %78.6 oranında direnç saptanmıştır. *C. albicans* izolatlarında ise flukonazol direnci saptanmamıştır. Çalışmamızdaki özellikle *C. glabrata* izolatlarındaki flukonazol direncinin yüksek olması, incelenen suşların mortal olgulardan izole edilmesine bağlanabilir.

Amfoterisin B, pek çok invaziv ve yaşamı tehdit eden mantar enfeksiyonlarının tedavisinde "altın standart" bir ilaçtır. Direnç ender görülmekle birlikte, yapılan çeşitli çalışmalarda değişen oranlarda (%2-30.4) amfoterisin B direnci bildirilmiştir<sup>(20,32-33)</sup>.

Çalışmamızda amfoterisin B'ye direnç saptanmamıştır.

Vorikonazol, yeni 2. jenerasyon triazol grubu antifungallerden olup, flukonazolün sentetik türevidir. Özellikle aspergilloz, skedosporiyoz, fusaryoz, kandidiasis tedavilerinde ve diğer duyarlı fungal enfeksiyon tedavisinde kullanılır. Çalışmamızda, vorikonazol direnci %4.1 olarak belirlenmiştir. Direncin türlere göre dağılımına baktığımızda ise *C. tropicalis* izolatlarında %15.4 oranında direnç tespit edilmiştir. Diğer izolatlar vorikonazole hassas bulunmuştur. Hazırolan ve ark.<sup>(24)</sup> çalışmalarında, 187 maya izolatu çalışmışlar, yalnızca bir *C. glabrata* (%1.8) suşunda vorikonazole direnç bildirmişlerdir. Hancı ve ark.<sup>(34)</sup> çalışmasındaki gibi %22.5 oranında daha yüksek direnç bildiren merkezler de bulunmaktadır.

Ekinokandin türevleri olan kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin günümüzde çeşitli mikozların tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Santaloya ve ark.<sup>(35)</sup> çok merkezli çalışmalarında kan örneklerinden izole edilen 315 *Candida* izolatında mikafungine %6.6 oranında direnç bildirmişlerdir. Uluslararası SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programı kapsamında 15.308 *Candida* izolatında mikafungin direnç oranı *C. glabrata* suşlarında %2.8, *C. tropicalis* suşlarında %1.3 olarak bildirilmiştir<sup>(36)</sup>. Ülkemizden bildirilen bir çalışmada ise, mikafungin direnci tüm izolatlar için %19, *C. albicans*'ta %21, *C. glabrata*'da %57 olarak saptanmıştır<sup>(19)</sup>. Çalışmamızda, *C. albicans* ve *C. glabrata* izolatlarında tüm suşlar mikafungine dirençli, üç *C. parapsilosis* izolatu da azalmış duyarlı olarak saptanmıştır. Çalışmamızdaki tüm izolatlarda mikafungin direnç oranları literatürdeki diğer çalışmalara göre yüksek olarak değerlendirilmiştir. Bu durum izolatların mortaliteye neden olan suşlar olması, olguların tamamına yakınının yoğun bakımda yatışı olup, ölen olgulardan izole edilmesi ve örnek sayımızın az olmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, adli otopsilerde ölüm sonrası mantar incelemeleri, bu gibi durumlarda ölüm nedenini açık-

lamakta yararlıdır. Ayrıca, postmortem olgulardan maya izolatlarının antifungal duyarlılıklarının daha fazla araştırılması ve raporlanması, ölümcül izolatlar için fenotipik verilerin tanımlanmasına izin verecektir. Böylece, yalnızca mevcut epidemiyolojik verilere değil, aynı zamanda bu tür enfeksiyonlara karşı tedavi protokollerinin geliştirilmesine de katkıda bulunacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev. 1996;9(4):499-511.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.499>
2. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 2009;52(3):197-205.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01691.x>
3. Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin B ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. Selçuk Tıp Derg. 2012;28:149-51.
4. Diagnani MC. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. F1000Prime Rep. 2014;6:81-7.  
<https://doi.org/10.12703/P6-81>
5. Dixon DM, Rhodes JC, Fromtling RA. Taxonomy, classification and morphology of the fungi, In "Manual of Clinical Microbiology", Ed. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, 8th edn. Washington DC: ASM Press, 2003:1653-9.
6. Savcı Ü, Yılmaz N. Çeşitli örneklerden izole edilen *Candidalar*ın tür dağılımı ve antifungal direnç oranları. Turk J Clin Lab. 2017;8(3):85-90.  
<https://doi.org/10.18663/tjcl.340562>
7. Jensen J, Muñoz P, Guinea J, Rodriguez-Crèixems M, Peláez T, Bouza E. Mixed fungemia: Incidence, risk factors and mortality in general hospital. Clin Infect Dis. 2007;44(12):e109-14.  
<https://doi.org/10.1086/518175>
8. Pagano L, Caira M, Nosari A, et al. The use and efficacy of empirical versus preemptive therapy in the management of fungal infections: the HEMA e-Chart Project. Haematologica 2011;96(9):1366-70.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2011.042598>
9. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann J, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. Clin Infect Dis. 2007;44(3):373-9.  
<https://doi.org/10.1086/509917>
10. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. Arch Intern Med. 1988;148(12):2642-5.  
<https://doi.org/10.1001/archinte.1988.00380120094019>
11. Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. Clin Infect Dis. 1998;27(4):781-8.  
<https://doi.org/10.1086/514955>
12. Espinel-Ingroff A, White T, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility test methods, In: Murray PR, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press, Washington, ABD; 2003: 1859-80.
13. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. (Approved standard. M27-S3), 3rd ed. CLSI, Wayne, ABD; 2008.
14. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th informational supplement, M27-S4, CLSI, Wayne, ABD; 2012.
15. Cornely OA. Aspergillus to zygomycetes: causes, risk factors, prevention and treatment of invasive fungal infections. Infection. 2008;36(4):296-313.  
<https://doi.org/10.1007/s15010-008-7357-z>
16. Bailly S, Maubon D, Fournier P, et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. - Trends over 10 years. J Infect. 2016;72(1):103-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.041>
17. Pfaller MA, Boyken LB, Hollis RJ, et al. Validation of 24-hour posaconazole and voriconazole MIC readings versus the CLSI 48-hour broth microdilution reference method: application of epidemiological cut off values to results from a global *Candida* antifungal surveillance program. J Clin Microbiol. 2011;49(4):1274-9.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02437-10>
18. Jung SI, Shin JH, Song JH et al and Korean Study Group for Candidemia. Multicenter surveillance of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates in South Korea. Med Mycol. 2010;48(4):669-74.  
<https://doi.org/10.3109/13693780903410386>
19. Kılınçel Ö, Akar N, Karamurat ZD, ve ark. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2018;48(4):256-63.  
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.256>
20. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi.

- ANKEM Derg. 2015;29(3):105-13.  
<https://doi.org/10.5222/ankem.2015.0105>
21. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2007;48(1):1-12.  
<https://doi.org/10.3314/jjmm.48.1>
22. Roux D, Gaudry S, Dreyfuss D, et al. *Candida albicans* impairs macrophage function and facilitates *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rat. *Crit Care Med*. 2009;37(3):1062-7.  
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819629d2>
23. Yapar N, Pullukçu IH, Avkan-Oğuz V, ve ark. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: a multicenter case-control study. *Med Mycol*. 2011;49(1):26-31.  
<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.501344>
24. Hazirolan G, Yıldiran D, Baran I, Mumcuoğlu I, Aksu N. Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2015;72(1):17-26.  
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.75010>
25. Thorn JL, Gilchrist KB, Sobonya RE, et al. Postmortem candidaemia: marker of disseminated disease. *J Clin Pathol*. 2010;63:337-40.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.2009.070607>
26. Koneman E, Davis M. Postmortem bacteriology. 3. Clinical significance of microorganisms recovered at autopsy. *Am J Clin Pathol*. 1974;61(1):28-40.  
<https://doi.org/10.1093/ajcp/61.1.28>
27. Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, et al. Trends in the prevalence of invasive fungal infections from an analysis of annual records of autopsy cases of Toho University. *Mycoses*. 2012;55(5):435-43.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02169.x>
28. Antinori S, Nebuloni M, Magni C, et al. Trends in the postmortem diagnosis of opportunistic invasive fungal infections in patients with AIDS: a retrospective study of 1630 autopsies performed between 1984-2002. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(2):221-7.  
<https://doi.org/10.1309/AJCPRAAE8LZ7DTNE>
29. Roberts FJ. Procurement, interpretation and value of postmortem cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17:821-7.  
<https://doi.org/10.1007/s100960050>
30. Yagmur G, Sav H, Ziyade N, et al. Evaluation of virulence factors and antifungal susceptibility in yeast isolated from postmortem specimens. *J Forensic Sci*. 2016;61(4):1000-6.  
<https://doi.org/10.1111/1556-4029.13089>
31. Wang H, Xiao M, Chen SC, et al. In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):3952-9.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01130-12>
32. Kooshki P, Rezaei-Matehkolaei A, Mahmoudabadi AZ. The patterns of colonization and antifungal susceptibility of *Candida*, isolated from preterm neonates in Khorramabad, South West of Iran. *J Mycol Med*. 2018;5233(17):30355-4.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.02.010>
33. Márquez F, Iturrieta I, Calvo M, Urrutia M, Godoy-Martínez P. Epidemiology and antifungal susceptibility of species producing candidemia in Valdivia, Chile. *Rev Chilena Infectol*. 2017;34(5):441-6.  
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500441>
34. Yılmaz Hancı S, Karaca Derici Y, Şirin MC, ve ark. Üçüncü basamak bir hastanede, geriyatrik olgularda izole edilen *Candida* türlerinin tiplendirilmesi ve kanda üreyen mayalarda antifungal duyarlılık. *Dicle Tıp Derg*. 2015;42(2):438-44.  
<https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2015.04.0605>
35. Santolaya ME, Thompson L, Benodal D, et al. A prospective, multi-center study of *Candida* bloodstream infections in Chile. *PLoS One*. 2019;14(3):e0212924.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212924>
36. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019;6(Suppl 1):S79-94.  
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>

# Gebelerde Sitomegalovirüs ile Rubella Seroprevalansının ve Yaş Bağlı Dağılımının Araştırılması

## Investigation of Cytomegalovirus and Rubella Seroprevalence and Age Related Distribution in Pregnant Women

Yasemin Derya Gülseren<sup>®</sup>, Fatma Esenkaya Taşbent<sup>®</sup>, Mehmet Özdemir<sup>®</sup>

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada, gebelerde rubella ve sitomegalovirus (CMV) seroprevalansını belirlemek ve yaş grupları ile ilişkisini araştırmak amaçlandı.

**Yöntem:** Ocak 2016 - Ocak 2019 tarihleri arasında, üçüncü basamak bir üniversite hastanesi merkez mikrobiyoloji laboratuvarında, 20. gebelik haftası ve altındaki gebelere ait hasta serumlarında, enzyme-linked fluorescent assay yöntemiyle çalışılan rubella antikorları, CMV antikorları ve CMV avidite testleri, geriye dönük olarak incelendi.

**Bulgular:** Çalışmaya katılan gebelerin yaş ortalaması 28.2±5.6 yıl olarak saptandı. Bu üç yıllık periyotta, rubella IgM için 4.236, rubella IgG için 720, CMV IgM için 3.793 ve CMV IgG için 148 sonuç irdelendi. Serum örneklerinde 21 olguda (%0.49) rubella IgM pozitifliği bulunurken, 30 olguda (%0.7) rubella IgM sınır değerinde bulundu. Rubella IgG açısından 692 olgu (%96.1) pozitif, 24 olgu ise (%3.3) sınır değerinde belirlendi. CMV IgM pozitifliği 10 olguda (%0.2), CMV IgM sınır değer 20 olguda (%0.52) bulunurken, CMV IgG araştırılan tüm hastalarda (148 olguda) pozitif olarak bulundu. Çalışmada, yaş arttıkça rubella IgG düzeyinde azalma, CMV IgG düzeyinde artış saptandı.

**Sonuç:** Bölgemizdeki gebelerde rubella seropozitiflik oranı %96.1 iken, CMV seroprevalansı %100 olarak bulunmuştur. Yüksek seroprevalans nedeniyle her ikisi içinde rutin tarama gereksiz gibi görünmektedir. Ancak rubella açısından, özellikle ileri yaş gebeliklerde, yaşla birlikte rubella IgG düzeyindeki düşme dikkate alınmalıdır. Ayrıca son yıllarda toplumda artma eğilimi gösteren aşı karşıtlığı nedeniyle, ilerleyen yıllarda konjenital rubella açısından gebe takibinin önem kazanacağı düşünülmektedir. Çalışmada, CMV açısından taranan tüm hastaların seropozitif bulunması düşük sosyoekonomik düzeyi işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** CMV, rubella, gebelik

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to determine the seroprevalence of Rubella and Cytomegalovirus (CMV) in pregnant women and to investigate their relationship with age groups.

**Method:** Rubella, CMV antibodies and CMV avidity tests performed by the enzyme-linked fluorescent assay method in sera of pregnant women under 20th gestational week at a University Hospital Central Microbiology Laboratory between January 2016 and January 2019 were retrospectively analyzed.

**Results:** The mean age of the pregnant women was 28.2±5.6 years. In this three-year period seroprevalence test results related to 4236 rubella IgM, 720 rubella IgG, 3793 CMV IgM and 148 CMV IgG antibodies were examined. Rubella IgM seropositivity was detected in 21 (0.49%) and borderline results in 30 (0.7%) cases. Rubella IgG seropositivity was detected in 692 (96.1%) and borderline results in 24 (3.3%) cases. CMV IgM seropositivity was detected in 10 (0.2%) and borderline results in 20 (0.52%) cases. CMV IgG seropositivity was detected in all (n=148) patients. Rubella IgG levels decreased and CMV IgG levels increased with age.

**Conclusion:** The seropositivity rate of rubella was found as 96.1% in pregnant women and the seroprevalence of CMV as 100%. Due to high seroprevalence, routine screening for both seems unnecessary. But the decrease in Rubella IgG levels with age should be taken into consideration in especially advanced age pregnancies. In addition, it is thought that rubella will gain importance in the following years due to the anti-vaccination tendency which has increased in the society in recent years. Seropositivity for CMV found in all patients scanned in the study indicates a low socio-economic level.

**Keywords:** CMV, rubella, pregnancy

Alındığı tarih:

25.03.2019

Kabul tarihi:

21.06.2019

Yayın tarihi:

30.09.2019

ORCID Kayıtları

Y. D. Gülseren 0000-0002-7877-5960

F. E. Taşbent 0000-0003-4190-5095

M. Özdemir 0000-0002-9316-771X

✉ fesentas@hotmail.com

## GİRİŞ

Gebelik sırasında geçirilen bazı viral enfeksiyonlar, annede ve bebekte önemli morbidite ve mortalite nedeni olabilmektedir<sup>(1)</sup>. Bebekte oluşan enfeksiyonun şiddeti virüs tipine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bazı virüsler teratojenik kabul edilirken, bazı virüs enfeksiyonları değişen derecelerde fetal hastalık oluşumuna neden olur<sup>(2)</sup>. Perinatal enfeksiyonların, tüm konjenital anomalilerin %2-3'lük kısmını oluşturduğu bildirilmektedir. Rubella ve CMV, TORCH grubu enfeksiyonları içerisinde yer alan ve en sık konjenital anomali nedeni olan etkenlerdir<sup>(3)</sup>.

Konjenital CMV enfeksiyonuna ait insidans gelişmiş ülkelerde %0.2-4 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir. Etkilenen fetüslerin %10-15'inin doğumda semptomatik olduğu saptanmıştır<sup>(4)</sup>. Semptomatik konjenital CMV enfeksiyonunda peteşi/purpura, hepatosplenomegali, koriyoretinit ve mikrosefali gibi çoklu organ tutulumu meydana gelir<sup>(1)</sup>. Semptomatik bebeklerin %10-15'i ölürken, yaşayanların %90'ı sekelli, %10'u sağlıklı olarak yaşamlarını sürdürür<sup>(5)</sup>. Asemptomatik konjenital CMV enfeksiyonuyla doğan bebeklerde uzun dönemde işitme kaybı, mental retardasyon ve nörolojik defisit gibi sekeller görülmektedir<sup>(6)</sup>. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 40.000 çocuk konjenital CMV enfeksiyonu ile doğmakta ve 8.000 çocukta uzun dönem sekeller görülmektedir. Virüsten etkilenen çocukların yıllık ekonomik maliyetinin ise 3 milyar dolardan fazla olduğu tahmin edilmektedir<sup>(4)</sup>.

Rubella 5-9 yaş arası geçirildiğinde, döküntüyle seyreden hafif bir hastalık tablosu şeklinde görülür<sup>(7)</sup>. Gebelik döneminde geçirildiğinde fetüste ciddi hasar oluşturabilmektedir. Konjenital Rubella sendromu (KRS) olarak adlandırılan bu sendrom, gebeliğin ilk iki ayı içerisinde enfeksiyonun geçirilmesiyle oluşur. Sendrom konjenital kalp hastalığı, glokom, katarakt, duyma bozuklukları ve zekâ geriliği gibi multiorgan hasarı ile sonuçlanır. Bunun yanı sıra insülin bağımlı diyabetes mellitus ve tiroitid gibi endokrinopatilerle de ilişkili bulunmuştur<sup>(8)</sup>.

1996 yılında yapılan bir çalışmada, ulusal aşı programına rubellanın dâhil edilmediği gelişmekte olan 78 ülkenin verileri analiz edilmiş, yaklaşık 110.000 (aralık;14.000-308.000) çocuğun KRS ile doğduğu bildirilmiştir. Aşı programı uygulayan ülke sayısının artışıyla birlikte enfeksiyonun kontrolünde aşama kaydedilmiştir<sup>(9)</sup>. Ancak hâlâ aşı programı uygulayan ülkeler nedeniyle dünya genelinde KRS yüksek insidansa sahiptir. Global insidansın 1.000 doğumda 0.1 ile 0.2 arasında olduğu ve yıllık 100.000'den fazla infantın KRS ile doğduğu bildirilmektedir. Salgın döneminde ise insidans 20 kat artabilmektedir. Aşının tam olarak uygulanmadığı Afrika ve Güneydoğu Asya'da 2010 yılında 100.000 canlı doğumda 121 gibi yüksek orana ulaştığı kaydedilmiştir<sup>(10)</sup>. Türkiye'de bulaşıcı hastalıklar sürveyans programı uygulamaya başlamadan önce, rubella ve KRS bildirim zorunlu hastalıklar arasında değildi. Yeni sürveyans sistemiyle birlikte, 2005 yılında doğrulanmış olgu sayısı 2.245 ve morbidite oranı 100.000'de 3.1 olduğu bildirilmiştir. KRS olan bir olgu kaydedilmiştir. Sürveyans sistemi yeni olduğu için olgu sayısının bildirilenden daha fazla olabileceği tahmin edilmektedir<sup>(11)</sup>. Ülkemizde rubella rutin aşılama programına 2006 yılında dâhil edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü raporuna Türkiye'den 2015-2019 yılları arasında tanısı doğrulanmış 21 rubella vakası bildirilmiştir. Bu olgulardan ikisinin bir yaş altında olduğu kaydedilmiştir<sup>(12)</sup>.

Bu çalışmada, gebelerde rubella ve CMV seroprevalansını belirlemek ve yaş grupları ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ocak 2016-Ocak 2019 tarihlerini içeren üç yıllık periyotta, bir üniversite hastanesi kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran, 20. gebelik haftası ve altındaki gebelere ait CMV ve rubella IgM-IgG seroprevalans oranları geriye dönük olarak incelenmiştir. Bu üç yıllık periyotta 15-49 yaş grubunda, CMV IgG için 148, CMV IgM için 3.793 ve rubella IgG için 720, Rubella IgM için 4.236 gebeye ait rutin sonuçlar taranmıştır. Üniversite hastanesinin

merkez mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen hasta serumlarında rubella antikorları, CMV antikorları ve avidite testleri enzyeme-linked fluorescent assay (ELFA) yöntemiyle (VIDAS bioMérieux, Fransa) çalışılmıştır. CMV ve rubella IgM antikorları için ilk çalışmada ara değer ve pozitif çıkan hasta örnekleri, yeni serum örnekleri ile yine çalışılmıştır. Rubella IgG için 10 IU/ml'nin altındaki değerler negatif, 10-15 IU/ml arasındaki değerler sınır değer, 15 IU/ml ve üzerindeki değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yine aynı sistemle CMV IgG antikorları için 4 UA/ml altındaki değerler negatif, 4-6 UA/ml arasındaki değerler sınır değer, 6 UA/ml ve üstündeki değerler pozitif kabul edilmiştir. CMV IgG avidite indeksi 6 IU/ml ve üzerindeki değerler yüksek avidite, 4 IU/ml altındaki değerler düşük avidite olarak değerlendirilmiştir.

Verilerin analizi için SPSS (ver 22.0, Chicago, IL, ABD) yazılım programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Serman's rho ve Kruskal Wallis testlerinden yararlanıldı, istatistik önemlilik eşik düzeyi olarak  $p < 0.05$  alındı.

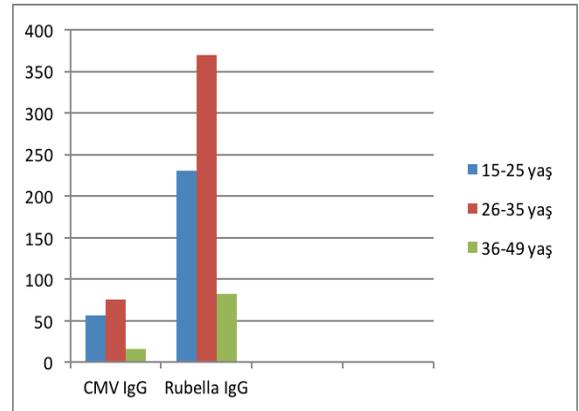
## BULGULAR

Çalışmada yer alan gebelerin yaş ortalaması  $28.2 \pm 5.6$  yıl olarak saptandı. Rubella IgM pozitifliği 21 olguda (%0.49) saptanırken, 30 olguda Rubella IgM (%0.7) sınır değerde bulundu. Rubella IgG için 692 olgu (%96.1) pozitif, 24 olgu (%3.3) sınır değerde belirlendi. CMV IgM için 10 olgu (%0.2) pozitif, 20 olgu ise

sınır değerde (%0.52) saptandı. Bu üç yıllık periyotta CMV IgG istenen gebelerin hepsinin (148 olgu) anti-kor düzeyi pozitif bulundu (Tablo 1). CMV IgM pozitif saptanan olgularda CMV IgG avidite testi yapıldı. Avidite indeksi hepsinde yüksek olarak belirlendi.

Çalışmadaki gebeler yaş gruplarına göre üç gruba ayrıldı (15-25, 26-35, 36-49). Rubella IgG ve CMV IgG seropozitiflik oranının yaşlara göre dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir. En yüksek seropozitiflik 26-35 yaş arasında saptandı.

Rubella IgG ve CMV IgG düzeyinin yaşla korelasyonu Serman's rho testiyle yapıldı. Rubella IgG anti-kor düzeyinin yaşla birlikte azaldığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ) (Şekil 2). CMV IgG düzeyinin yaşla birlikte anti-kor düzeyi artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3).

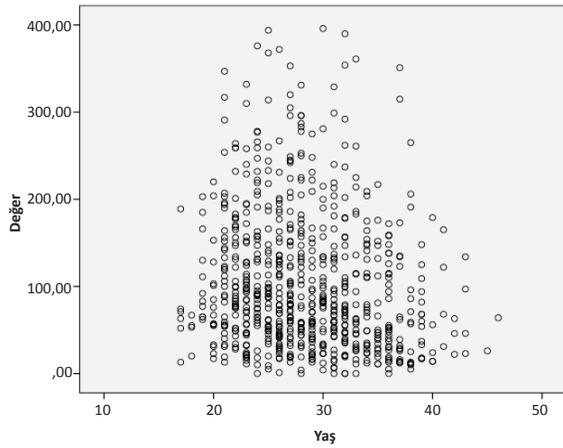


Şekil 1. Rubella ve sitomegalovirüs IgG pozitifliklerinin yaş gruplarına göre dağılımı.

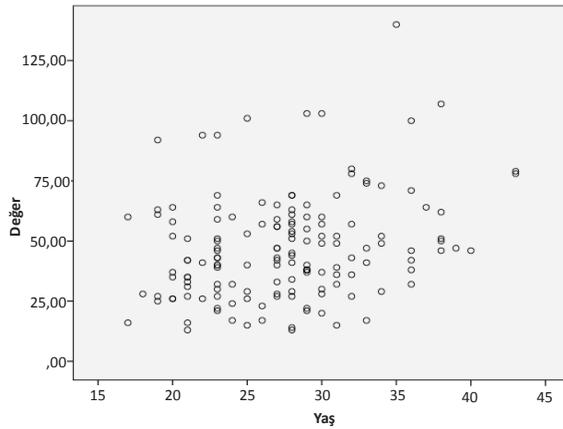
Tablo 1. Rubella IgG, IgM ve CMV IgG, IgM pozitiflik ve sınır değerlerinin yıllara göre sayı ve yüzde dağılımları.

Yıllar	Rubella IgM		Rubella IgG		CMV IgM		CMV IgG	
	Pozitif n/N (%)	Sınır Değer n/N (%)	Pozitif n/N (%)	Sınır Değer n/N (%)	Pozitif n/N (%)	Sınır Değer n/N (%)	Pozitif n/N (%)	Sınır Değer n/N (%)
2016	5/1431 (0.3)	9/1431 (0.6)	213/231 (92)	10/231 (4.3)	31/31 (100)	0/31 (0)	31/31 (100)	0/31 (0)
2017	9/1431 (0.6)	8/1431 (0.5)	267/276 (96.7)	7/276 (2.5)	41/41 (100)	0/41 (0)	41/41 (100)	0/41 (0)
2018	7/1392 (0.5)	13/1392 (0.9)	203/213 (95.3)	7/213 (3.2)	76/76 (100)	0/76 (0)	76/76 (100)	0/76 (0)
Toplam (%)	21/4236 (0.49)	30/4236 (0.7)	692/720 (96.1)	24/720 (3.3)	148/148 (100)	0/148 (0)	148/148 (100)	0/148 (0)

n: Pozitif test sayısı



Şekil 2. Rubella IgG düzeyinin yaşa bağlı dağılımı.



Şekil 3. CMV IgG düzeyinin yaşa bağlı dağılımı.

Tablo 2. Yaş gruplarının rubella IgG median değerlerinin karşılaştırılması.

Yaş grupları	Sayı	Rubella IgG median (IU/ml)
15-25	240	98
26-35	387	204
36-49	93	60

Tablo 2’de yaş gruplarının rubella IgG median değerleri görülmektedir. On beş-yirmi beş yaş grubunda 98 IU/ml, 26-35 yaş grubunda 204 IU/ml, 36-49 yaş grubunda 60 IU/ml olarak saptandı. Yaş grupları arasında antikor median değerleri Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p<0.05$ ). Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek için post hoc Bonferroni-Dunn testi yapıldı. Otuz altı-kırk beş yaş grubu antikor düzeyinin 15-25 yaş grubundan ( $p<0.05$ ) ve 26-35 yaş grubundan ( $p<0.05$ ) anlamlı olarak düşük olduğu bulundu.

## TARTIŞMA

CMV ve Rubella, prenatal ve perinatal dönemde sıklıkla enfeksiyona neden olabilen viral etkenlerdir. Enfeksiyon hem annede hem de bebekte önemli komplikasyonlara neden olabilmektedir<sup>(1)</sup>. Ancak bu virüsler için prenatal tarama gerekliliği tartışmalı bir konu olmaya devam etmektedir<sup>(13)</sup>.

Gebelikte geçirilen primer CMV enfeksiyonu yüksek plasental geçiş ve ciddi fetal hasar riskine sahiptir. Annenin immünitesi plasental geçişte önemli bir faktördür. CMV diğer Herpes virüs ailesi gibi latent kalabildiği için reaktivasyona neden olabilir. Hem reaktivasyon hem de reenfeksiyon fetal enfeksiyon riski taşır<sup>(2)</sup>. Ancak seronegatif gebe primer CMV enfeksiyonu açısından ciddi risk altındadır. Gebelik planlayan CMV seronegatif bir kadının CMV enfeksiyonu açısından çok daha dikkatli olması gerekir<sup>(14)</sup>.

CMV seroprevalansı toplumdan topluma değişkenlik gösterir ve yaşa bağlı olarak artış izlenir. Gelişmiş ülkelerde doğurganlık çağındaki kadınlarda seroprevalansı %50-85 arasında değişmektedir. Gelişmekte olan ülkelere ise kalabalık yaşam koşulları nedeniyle enfeksiyonla erken yaşta karşılaşılması nedeniyle seroprevalansı %100’e yakındır. Seroprevalansın yüksek olmasını etkileyen diğer faktörler ise emzirme, beyaz ırk olmamak, küçük yaş çocuk bakımı ve düşük sosyoekonomik düzeydir<sup>(15)</sup>.

Suudi Arabistan’da<sup>(16)</sup> yapılan bir çalışmada CMV seropozitiflik oranı %92, Singapur’da<sup>(17)</sup> ise %87.5 saptanmıştır. Ülkemizde, CMV seropozitifliği ortak kullanım alanları, hijyen koşulları ve sosyoekonomik koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterir<sup>(18)</sup>. Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, %92.6-%100 arasında değişen oranlar bildirilmiştir<sup>(19-24)</sup>. Bölgemizde 2012 yılında Özdemir ve ark.<sup>(20)</sup> çalışmalarında CMV seropozitiflik oranı %96 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, CMV seropozitifliği %100 oranında bulundu. Bölgemizde hijyen ve sosyoekonomik koşullar, yüksek seropozitiflikte etkili olabilecek faktörlerdir. Bunun yanı sıra ülkemizdeki kreş-anaokulu-

ilkokula giden yaş grubunun toplam nüfusa oranının birçok batı ülkesi ile kıyaslandığında daha yüksek olması ve bu yaş grubu çocukların enfeksiyonun toplumsal yayılımında çok önemli bir neden olduğu da dikkate alınmalıdır.

Konjenital CMV enfeksiyonu dünyada en sık görülen konjenital enfeksiyondur. Gelişmiş ülkelerde oran %0.6 ile %0.7 arasındadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise bu oran annedeki seroprevalansa paralel olarak artış gösterir ve oran %1-5 arasındadır<sup>(15)</sup>.

Ülkemizde konjenital CMV enfeksiyonuna yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır. Zeytinoğlu ve ark.<sup>(25)</sup> 1.000 yenidoğandan alınan tükürük örneklerinde CMV DNA pozitifliğini %1.6 ve konjenital CMV enfeksiyonu oranını %0.2 olarak belirlemişlerdir.

Eres ve ark.<sup>(26)</sup> 1147 yenidoğan tükürük örneğinde %3.3 oranında CMV DNA pozitifliği saptamışlar ve 10 olguda konjenital CMV enfeksiyonu olduğunu saptamışlardır.

CMV etkenine yönelik uygun bir aşı ve tedavi henüz yoktur. Bu nedenle konjenital CMV enfeksiyonu için hem anne hem de bebekte tarama yapılmasına yönelik evrensel bir öneri bulunmamaktadır. Ancak gebelik döneminde seronegatif anne adaylarının primer enfeksiyonunun yanı sıra reaktivasyon/reenfeksiyonu da vertikal geçişe neden olabilmektedir ve bebekte nörosensöriyel işitme kaybı başta olmak üzere çeşitli malformasyonlar gelişebilmektedir<sup>(25)</sup>. Yapılan çalışmalarda, erken tanı ve müdahalenin özellikle nörolojik bulgular üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir<sup>(27)</sup>. Bu nedenle, bu bebeklerin konjenital enfeksiyon yönünden izlenmesi gerekir. Maternal tanı sonrası erken dönemde gebelik sonlandırılmamış ise virüsün tespiti için amniyon sıvı örnekleme yapılmalıdır. Örneklem için en uygun zaman maternal enfeksiyondan en az 6-9 hafta sonrasıdır<sup>(2)</sup>. Çalışmamızda, CMV IgM pozitifliği %0.2 olarak bulundu. CMV IgM ve CMV IgG birlikte pozitif bulunan hastalarda avidite testi uygulandı. Yüksek avidite indeksi belirlendi. Elde edilen yüksek avidite oranları

eski enfeksiyon olarak değerlendirildi ve amniyon sıvı örnekleme yapılmadı.

Rubella seropozitifliği dünyanın farklı bölgelerinde değişkenlik göstermektedir. Bu oran Nijer'de %53, Sudan'da %63 ve Tayvan'da %89 olarak bulunmuştur<sup>(28-30)</sup>. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden yapılan çalışmalarda, %66.9 ile %99.5 arasında değişen oranlarda Rubella IgG pozitifliği bildirilmiştir<sup>(23,24,31-34)</sup>. Bölgemizde 2012 yılında Özdemir ve ark.<sup>(20)</sup> çalışmalarında, %96.4 oranında seropozitiflik bildirmişlerdir. Çalışmamızda, rubella seropozitifliği %96.1 olarak saptandı.

Rubella için 10-15 IU/ml IgG antikor koruyucu kabul edilmektedir<sup>(2)</sup>. Çalışmamızda, rubella IgG için 10 IU/ml altı değerler negatif, 10-15 IU/ml arasındaki değerler sınır değer, 15 IU/ml ve üzerindeki değerler pozitif olarak değerlendirildi. Bu nedenle sınır değer belirlenen hastaların da koruyucu antikor düzeyinde olduğu söylenebilir. Yüksek seropozitiflik oranının, çocukluk çağında geçirilen enfeksiyon sonrası kazanılan doğal immünite veya son yıllarda uygulanan aşı programlarının sonucu olduğu düşünülmektedir.

Ülkemizde rubella aşısı yapılmamış ve enfeksiyonu geçirmemiş gebelerde tarama önerilirken, diğerleri için tarama maliyet etkin bulunmamıştır<sup>(35)</sup>. Doğal immüniteye bağlı oluşan antikor düzeyinin ömür boyu koruduğu bilinmektedir. Aşıya bağlı oluşan antikor düzeyinin 16 yıldan fazla koruyucu olduğu kabul edilir. Ancak aşı uygulanan bireylerin küçük bir kısmında 5-8 yıl içerisinde antikor düzeyi belirlenemeyecek sınıra düşer<sup>(2)</sup>. Bu nedenle gebelik planlayan bir kadının aşılı olması durumunda da koruyucu antikor düzeyinde olup olmadığını saptamak için antenatal tarama yapılması yararlı olur.

Çalışmamızda, yaş arttıkça rubella IgG düzeyinde azalma, CMV IgG düzeyinde artış saptadık. Nisbet ve ark.'nın<sup>(36)</sup> çalışmalarında, yaşa bağlı farklılık belirlenmemiştir. Varıcı ve ark.'nın<sup>(14)</sup> çalışmalarında ise, çalışmamıza benzer şekilde yaşla birlikte rubella IgG düzeylerinde düşme belirlenmiştir. Akşit ve ark.<sup>(37)</sup> çalışmalarında yaşla birlikte rubella seropozitiflik

oranında hafif bir artış saptamışlar ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulmuşlar. Literatürde yapılan farklı çalışmalarda, rubella seropozitifliğinin yaşla birlikte değişimine yönelik farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Ancak CMV seropozitifliğinin yaşla birlikte artış gösterdiği net olarak ortaya konmuştur<sup>(15)</sup>.

Rubella aşısı İtalya'da 1999'da rutin aşı programına girmesine rağmen, 2005-2013 yılları arasında 75 konjenital rubella olgusu bildirilmiştir. Bu olguların önlenmesi için gebelik öncesi antikor taraması ve postpartum dönemdeki bireyleri içeren erişkin aşılanma programının yürütülmesi gerektiği ileri sürülmüş<sup>(38)</sup>. İngiltere'den bildirilen bir konjenital rubella olgusu, dikkati göçmenlerin aşılanmasına yöneltmiştir<sup>(39)</sup>. Giderek artan aşı karşıtlığı özellikle Amerika'da dönem dönem kızamık salgınlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Benzer bir durumun rubella içinde söz konusu olabileceği öngörülmektedir<sup>(40)</sup>.

Sonuç olarak, çalışmamızda bölgemizdeki rubella seropozitifliği yüksek oranda (%96.1) belirlenmiştir. Bu nedenle tarama stratejisi olarak gerekli olmamakla birlikte, yaşla birlikte rubella IgG düzeyindeki düşme dikkate alınmalıdır. Ayrıca rubella aşısının rutin aşılanma programına 2006 yılında alındığı düşünüldüğünde, 2030 yılına kadar erişkin aşılamaya gereksinim vardır. Bir diğer önemli konu, Türkiye'de de son yıllarda aşı karşıtı bireylerin sayısı artmakta ve bu kişiler çocuklarına aşı yaptırmayı ret etmektedir<sup>(41)</sup>. Dolayısıyla toplumumuzda aşılanmayan bireylerin olması, konjenital rubella olgularının ilerleyen yıllarda artan sayılarda karşımıza çıkabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır. Bundan dolayıdır ki tarama programlarının gerekebileceği ve toplumdaki önceki seroprevalans çalışmalarına gereksinim duyulacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, CMV seropozitifliği (%100) oldukça yüksek oranda saptanması düşük sosyoekonomik düzeyi işaret etmektedir. Bu etken içinde tarama gerekli görünmemekle birlikte, seronegatif gebe pri-

mer CMV enfeksiyonu açısından risk altında olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Us AD, Ergünay K, eds. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi; 2012.
2. Mendelson E, Aboudy Y, Smetana Z, Tepperberg M, Grossman Z. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reprod Toxicol.* 2006;21(4):350-82. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.02.001>
3. Stegmann BJ, Carey JC. Toxoplasmosis, other (syphilis, varicella zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. *Curr Womens Health Rep.* 2002;2(4):253-8.
4. Tanimura K, Yamada H. Potential biomarkers for predicting congenital cytomegalovirus infection. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):pii.E3760 <https://doi.org/10.3390/ijms19123760>
5. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. İstanbul:İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.
6. Pass RF. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev.* 2002;23(5):163-9.
7. Neyzi O, Ertuğrul T, ed. Pediatri. İstanbul: İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
8. Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. *Lancet.* 2015;385(9984):2297-307. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60539-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60539-0)
9. Vynnycky E, Adams EJ, Cutts FT, et al. Using seroprevalence and immunisation coverage data to estimate the global burden of congenital rubella syndrome, 1996-2010: A systematic review. *PLoS One.* 2016;11(3):e0149160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149160>
10. Chotta NAS, Mgongo M, Uriyo JG, et al. Awareness and factors associated with health care worker's knowledge on rubella infection: A study after the introduction of rubella vaccine in Tanzania. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(10):pii.E1676. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101676>
11. Aksakal FN, Maral I, Çırak MY, Aygun R. Rubella seroprevalence among women of childbearing age residing in a rural region: Is there a need for rubella vaccination in Turkey? *Jpn J Infect Dis.* 2007;60(4):157-60.
12. <https://www.who.int/immunization/diseases/Rubella/en/> (Erişim tarihi: 28.05.2019)
13. Bakıcı MZ, Nefesoğlu N, Erandaç M. Mikrobiyoloji

- laboratuvarına gönderilen kan örneklerinde bir yıllık TORCH incelemesi sonuçlarının değerlendirilmesi. CÜ Tıp Fak Derg. 2002;24:5-8.
14. Varıcı Balcı FK, Arslan A, Sertöz R ve ark. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran gebelerde rubella ve sitomegalovirüs seroprevalansı. Ege Tıp Derg. 2014;53(4):179-83.  
<https://doi.org/10.19161/etd.344083>
  15. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. Ital J Pediatr. 2017;43(1):38-8.  
<https://doi.org/10.1186/s13052-017-0358-8>
  16. Ghazi HO, Telmesani AM, Mahomed MF. TORCH agents in pregnant Saudi women. Med Princ Pract. 2002;11(4):180-2.  
<https://doi.org/10.1159/000065813>
  17. Wong A, Tan KH, Tee CS, Yeo GS. Seroprevalence of cytomegalovirus, toxoplasma and parvovirus in pregnancy. Singap Med J. 2000;41(4):151-5
  - 18) Uysal A, Taner CE, Cüce M, et al. Cytomegalovirus and rubella seroprevalence in pregnant women in Izmir/Turkey: follow-up and results of pregnancy outcome. Arch Gynecol Obstet. 2012;286(3):605-8.  
<https://doi.org/10.1007/s00404-012-2353-z>
  19. Uyar Y, Balci A, Akcali A, Cabar C. Prevalence of rubella and cytomegalovirus antibodies among pregnant women in northern Turkey. New Microbiol. 2008;31(4):451-5.
  20. Özdemir M, Taşbent FE, Terzi HA, et al. Seroprevalence of major viral pathogens during pregnancy: A multicenter study in Turkey. Adv Clin Med Microbiol. 2016;1(1):1-5
  21. Bakacak M, Bostancı MS, Bülent Köstü B ve ark. Gebelerde *Toxoplasma gondii*, rubella ve sitomegalovirüs seroprevalansı. Dicle Tıp Derg. 2014;41(2):326-31.  
<https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2014.02.0425>
  22. Efe Ş, Kurdoğlu Z, Korkmaz G. Van yöresindeki gebelerde sitomegalovirüs, rubella ve toksoplazma antikorlarının seroprevalansı. Van Tıp Derg. 2009;16(1):6-9.
  23. Tamer GS, Dundar D, Caliskan E. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in western region of Turkey. Clin Invest Med. 2009;32(1):E43-7.
  24. Ocak S, Zeteroğlu S, Ozer C, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in southern Turkey. Scand J Infect Dis. 2007;39(3):231-4.  
<https://doi.org/10.1080/00365540600978880>
  25. Zeytinoğlu A, Terek D, Arslan A ve ark. Yenidoğan bebeklerin tükürük örneğinde CMV DNA varlığı ile konjenital CMV enfeksiyonunun araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2019;53(1):53-60.  
<https://doi.org/10.5578/mb.67724>
  26. Eres SZ, Sağlık I, Mutlu D, et al. Konjenital sitomegalovirüs enfeksiyonu prevalansı in newborns in Turkey. 17th Annual Meeting of ESCV 2014, Prag, Çekya; 2016:P04-03.
  27. Tanimura K, Yamada H. Maternal and neonatal screening methods for congenital cytomegalovirus infection. J Obstet Gynaecol Res. 2019;45(3):514-21.  
<https://doi.org/10.1111/jog.13889>
  28. Hamdan HZ, Abdelbagi IE, Nasser NM, Adam I. Seroprevalence of cytomegalovirus and Rubella among pregnant women in western Sudan. Virol J. 2011;11(8):217.  
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-217>
  29. Onakewhor JU, Chiwuzie J. Seroprevalence survey of rubella infection in pregnancy at the University of Benin Teaching Hospital. Niger J Clin Pract. 2011;14(2):140-5.  
<https://doi.org/10.4103/1119-3077.84002>
  30. Lin CC, Yang CY, Shih YL, et al. Rubella seroepidemiology and estimations of the catch-up immunisation rate and persistence of antibody titers in pregnant women in Taiwan. BJOG. 2011;118(6):706-12.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.02903.x>
  31. Sağsöz N, Apan T. The rates of tetanus, hepatitis B and rubella seropositivity in pregnant women. Türkiye Klinik J Gynecol Obst. 2002;12(1):52-5.
  32. Tekin A, Deveci Ö, Yula E. The seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and rubella virus among childbearing age women in Mardin province. J Clin Exp Invest. 2010;1(2):81-5.  
<https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2010.02.0017>
  33. Aşık G, Ünlü BS, Er H ve ark. Afyon bölgesinde gebelerde toksoplazma ve rubella seroprevalansı. Pam Tıp Derg. 2013;6(3):128-32.
  34. Toklu GD. Gebelerde toksoplazma, rubella virüs ve sitomegalovirüs'e karşı oluşan antikorların sıklığı. J Clin Anal Med. 2013;4:38-40.  
<https://doi.org/10.4328/JCAM.896>
  35. Yılmaz M, Altındiş M, Cevrioğlu S, Fenkci V, Aktepe O, Sırthan E. Afyon bölgesinde yaşayan gebe kadınlarda toksoplazma, sitomegalovirus, rubella, hepatit B, hepatit C seropozitiflik oranları. Kocatepe Tıp Derg. 2004;5:49-53.
  36. Nisbetli AI, Omuse G, Revathi G. Seroprevalence data at a private teaching hospital in Kenya: An examination of *Toxoplasma gondii*, cytomegalovirus, rubella, hepatitis A, and *Entamoeba histolytica*. PLoS One. 2018; 13(10):e0204867.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204867>
  37. Aksit S, Timocin A, Torpculu A. Rubella immunity in pregnant Turkish women. Int J Gynaecol Obstet

- 1999;66(1):33-4.  
[https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(99\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(99)00019-3)
38. Giambi C, Fila A, Rota MC, et al. Congenital rubella still a public health problem in Italy: analysis of national surveillance data from 2005 to 2013. *Euro Surveill.* 2015;20(16):pii.21103.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.16.21103>
39. Marchant E, Bishop L, Flaxman D, et al. A case of congenital Rubella syndrome and infection in South-East London in 2015. *Bri J Gen Pract.* 2016;66(653): 635-6.  
<https://doi.org/10.3399/bjgp16X688321>
40. Zipprich J, Winter K, Hacker J, Xia D, Watt J, Harriman K; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Measles outbreak - California, December 2014-February 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(6):153-4.
41. Kutlu HH, Altındış M. Aşı karşıtlığı. *Flora.* 2018;23(2):47-58.  
<https://doi.org/10.5578/flora.66355>

# *Cryptosporidium* spp.'nin Realtime PCR Yöntemi ile Saptanması İçin Metot Verifikasyon Çalışması

## Method Verification Study for Detection of *Cryptosporidium* spp. by Realtime PCR Method

Selma Usluca\*<sup>✉</sup>, Asiye Evren Eken Berberoğlu\*<sup>✉</sup>, Bekir Çelebi\*\*<sup>✉</sup>, Selçuk Kılıç\*<sup>✉</sup>

\*Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ankara

\*\*Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara

### ÖZ

**Amaç:** *Cryptosporidium* spp. özellikle gıda ve su kaynaklı ishal nedenleri arasında önemli bir parazittir. Bu çalışmada, dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp.'nin rutin tanısında kullanılan moleküler yöntemin metot verifikasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bu amaçla *Cryptosporidium parvum* pozitif buzağı dışkı örneği PBS ile dilüe edilmiş ve *Cryptosporidium*/*Giardia* direkt floresan antikor kiti kullanılarak ookist sayımı yapılmıştır. Aynı örneğe ticari kit ile DNA ekstraksiyonu uygulanmıştır. Elde edilen DNA örneği kullanılarak *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*'in moleküler yöntemlerle saptanması için multiplex PCR kiti kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** PCR'in saptama limiti 8 ookist/reaksiyon olarak belirlenmiştir. Daha sonra yüksek ve düşük pozitif örnekler hazırlanmış, iki farklı analist ile doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapılarak testin metot verifikasyonu tamamlanmıştır.

**Sonuç:** Metot verifikasyon çalışmalarının varyasyon katsayıları %15'in altında olduğu için testin, rutin hasta örneklerinde *Cryptosporidium*'un araştırılmasına uygun olduğu karar verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Cryptosporidium* spp., realtime PCR, metot verifikasyon

### ABSTRACT

**Objective:** *Cryptosporidium* spp. is an important parasite, especially among the causes of foodborne and waterborne diarrhea. The aim of this study was to verify the molecular method used for routine diagnosis of *Cryptosporidium* spp. in stool samples.

**Methods:** For this purpose, *Cryptosporidium parvum* positive calf stool sample was diluted with PBS and oocysts were counted using *Cryptosporidium*/*Giardia* direct fluorescein antibody assay. DNA extraction from the same sample was carried out using a commercial kit after determining the number of oocysts in the sample. PCR amplification was performed using multiplex PCR assay for molecular detection of *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* in the DNA sample retrieved.

**Results:** The detection limit was determined as 8 oocysts/reaction. Then, high and low positive samples were prepared, and accuracy and precision studies of the method were performed by two different analysts to complete verification analysis of the test method.

**Conclusion:** Since variation coefficients of method verification studies were below 15%, it was decided that the test was suitable for investigation of *Cryptosporidium* spp. in routine patient samples.

**Keywords:** *Cryptosporidium* spp., realtime PCR, method verification

### Alındığı tarih:

12.06.2019

### Kabul tarihi:

05.07.2019

### Yayın tarihi:

30.09.2019

### ORCID Kayıtları

S. Usluca 0000-0002-8934-439X

A. E. E. Berberoğlu 0000-0002-3849-0119

B. Çelebi 0000-0002-4545-5573

S. Kılıç 0000-0002-4993-650X

✉ selmausluca@gmail.com



## GİRİŞ

*Cryptosporidium* apikompleksa cinsi, zorunlu hücre içi bir protozoon parazittir. Gastrointestinal sistem epitel hücrelerini enfekte eder, akut ve bol sulu ishale neden olur<sup>(1)</sup>. İshal, immun sistemi sağlam bireylerde kendi kendini sınırlarken, immun sistemi baskılanmış konaklarda kronik ve yaşamı tehdit edici olabilir<sup>(1,2)</sup>. Parazit özellikle gıda ve su kaynaklı ishal nedenleri arasında önemli bir yer tutmaktadır<sup>(1,3-5)</sup>. İnsan ve hayvan dışkılarında bulunan *Cryptosporidium* ookistleri çevreye yayılır ve su kaynaklarına ulaşır. Enfektif dozun düşük olması ve ookistlerin geleneksel su arıtma yöntemlerine dayanıklı olması insanlar için bulaş riskini arttırmaktadır<sup>(5,6)</sup>. Kuyu suları ve hijyenik olmayan içme suyu kaynaklarından köken alan *Cryptosporidium* salgınları bildirilmiştir<sup>(7,8)</sup>. Şehir şebeke suyu ve şişelenmiş su tüketimi ile karşılaştırıldığında, artezyen ve kuyu suyu tüketimi olanlarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyon oranının belirgin olarak yüksek olduğu görülmektedir<sup>(8)</sup>. Bunun dışında, özellikle yaşlılar veya çocuklar arasında, günlük bakım merkezlerinde yayılım daha kolay olmaktadır. Bazı meslek gruplarında (hayvancılıkla uğraşanlar, veterinerler, laboratuvar personeli, kreş personeli), endemik bölgelere yolculuk edenlerde, hijyenik koşulların yetersiz olduğu yerlerde yaşayanlarda ve enfekte kişilerle yakın temas edenlerde daha yüksek oranda görülmektedir<sup>(9)</sup>.

Bugüne kadar 20'den fazla tür tanımlanmış ve çeşitli konaklarda saptanmıştır. İnsanlarda olguların çoğuna *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*) ve *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) neden olmaktadır. Bunun dışında, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis* de bildirilmiştir<sup>(2,3,6,10,11)</sup>. *C. hominis* esas olarak insanları enfekte ederken, en yaygın zoonotik tür olan *C. parvum* çok sayıda hayvanı ve insanı enfekte ederek zoonotik bulaşta rol oynamaktadır<sup>(1,6)</sup>. *Cryptosporidium* türlerinin ve genotiplerinin tanımlanması, hayvan veya çevresel kaynaklı *Cryptosporidium* ookistlerinin halk sağlığı açısından önemini değerlendirmek ve enfeksiyon veya kontaminasyon kaynaklarını izlemek için önemlidir<sup>(3,6,8,11)</sup>.

*Cryptosporidium* spp.'nin rutin tanısının acid-fast boyama ve DFA gibi mikroskopik yöntemlerle rahatlıkla konulmasına rağmen, çeşitli nedenlerle morfolojik tanımlamanın güçleştiği ya da özellikle salgınlar gibi hızlı sonuç verilmesi gereken durumlarda moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada, özellikle ishal etiyolojisinin araştırılması amacıyla laboratuvarımıza gönderilen dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp.'nin rutin tanısında kullanılan moleküler yöntemin metod verifikasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

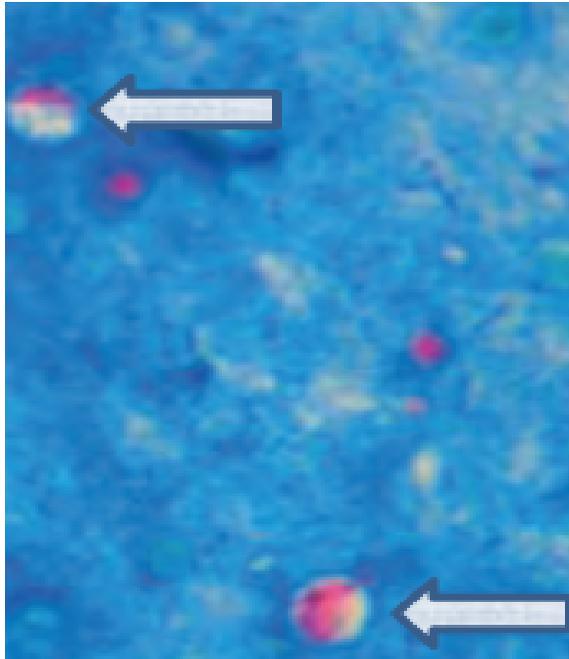
## GEREÇ ve YÖNTEM

PCR'ın saptama limitinin belirlenmesi için dışkı örneğindeki ookist sayımının ilk olarak Kinyoun acid-fast boyama yöntemiyle yapılması düşünüldü. Bu amaçla *C. parvum* pozitif buzağı dışkı örneği PBS ile iki kat sulandırıldı. Sulandırım için beş tüpe 1'er ml PBS dağıtıldı. İlk tüp içerisine 1 ml sulu dışkı örneği eklenerek homojenize edildi. Buradan 1 ml alınarak seri dilüsyonlar tamamlandı. Her bir dilüsyondan 10 µl dışkı alınıp yayma preparat hazırlandı. Preparat Kinyoun acid-fast boyası ile boyanarak X1000 büyütme ile parazit sayımı yapıldı. Aynı örnekler içerisinden 10 µl alınıp DFA lamına yayıldı. *Cryptosporidium*/*Giardia* DFA kiti (Crypto/*Giardia*Cel CeLLabs, Avustralya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda direkt floresan antikor yöntemi uygulanarak X400 büyütme ile floresan mikroskopta parazit sayımı yapıldı. Ookist sayısı belirlenmiş 200 µl dışkı örneğinden QiAmp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyonu uygulandı. DNA örneğinden (200 µl) log10 tabanında seri dilüsyonlar hazırlandı ve dilüsyonlardan 10 µl DNA, saptama limiti çalışmasında kullanıldı. Easy Plex cihazı (Aus Diagnostics, Avustralya) ile *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*'i birlikte saptayan Aus Diagnostics Multiplexed Diagnostics Gastrointestinal Parasites (5Plex) kiti (Aus Diagnostics, Avustralya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda Rotorgene Q cihazında PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Kullanılan

multipleks PCR setinin içerisinde *Cryptosporidium* için, *Cryptosporidium* ookist duvar proteinine yönelik primerler bulunmaktadır. PCR amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonunun ardından 95°C'de 10 dakika, 60°C'de 15 sn. ve 72°C'de 15 sn. 40 siklus olmak üzere uygulandı. DNA dilüsyonlarının PCR sonucuna göre pozitif olarak belirlenen son dilüsyondaki ookist sayısı yöntemin saptama limiti olarak değerlendirildi. Yüksek pozitif olarak saptama limiti değerinden  $1\log_{10}$  daha yüksek değer, düşük pozitif olarak ise saptama limitinin  $1\log_{10}$  katının yarısı değer kabul edildi ve testin metod verifikasyonu için iki farklı analist ile doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapıldı. Doğruluk çalışması için üç yüksek pozitif, üç düşük pozitif, üç negatif örnek birer kez çalışıldı. Çalışmalar arası kesinlik çalışması için üç farklı günde birer adet yüksek ve düşük pozitif örnek çalışıldı. Çalışma içi kesinlik çalışması için üç adet yüksek, üç adet düşük pozitif örnek çalışıldı.

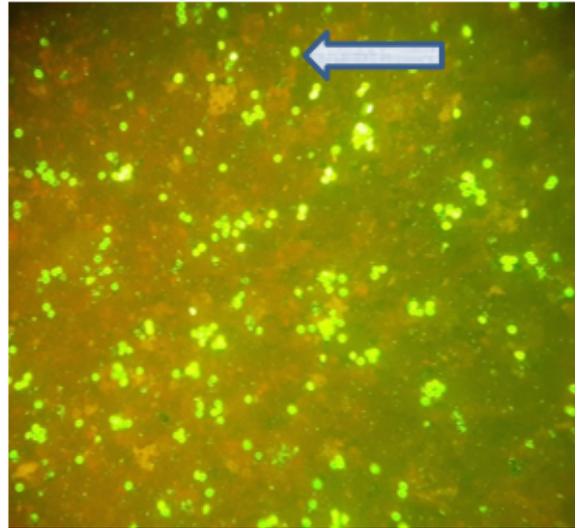
## BULGULAR

PCR'ın saptama limitinin belirlenmesi için Kinyoun acid-fast boyama yöntemiyle dışkı örneğindeki ookist sayımı yapıldı, 10 µl dışkı içerisinde 281 ookist sayıldı (Şekil 1).



Şekil 1. Kinyoun acid-fast boyama yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookistleri (X1000 büyütme ile).

Ancak elde edilen PCR saptama limitinin, Kinyoun acid-fast boyasındaki ookist sayısına göre çok düşük belirlendiği görüldü. Bunun üzerine Kinyoun acid-fast boyasının dışkıda bulunan tüm ookistleri belirlemediği düşünülerek ookist sayımının altın standart yöntem olan DFA yöntemiyle yapılmasına karar verildi. DFA yöntemi ile 10 µl dışkı içerisindeki ookist sayısı 1.616 olarak belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. DFA yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookistleri (X400 büyütme ile).

DFA yöntemi ile parazit sayımı yapılan dışkı örneğinden (200 µl) ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen DNA örneğinden (32.320 ookist/200 µl) saptama limiti (LOD) tespiti için  $\log_{10}$  seri dilüsyonları hazırlandı. Her dilüsyondan 10 µl DNA reaksiyona katıldığında reaksiyondaki ookist miktarları Tablo 1'de verildi.

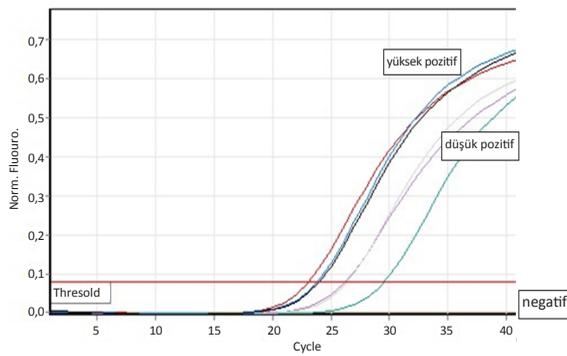
Saptama limitinin,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  dilüsyonlar arasındaki bir değer olduğu düşünülerek  $10^{-2}$  dilüsyon ½ oranında

Tablo 1. PCR reaksiyonundaki ookist miktarları.

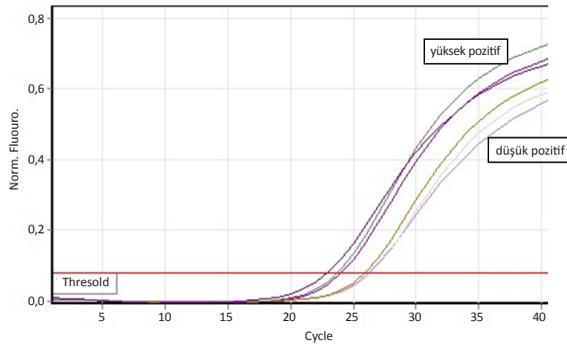
DNA dilüsyonları	Reaksiyondaki ookist miktarı	Sonuç/CT
100	1.616	Pozitif (19.81)
$10^{-1}$	161	Pozitif (23.02)
$10^{-2}$	16	Pozitif (26.27)
$10^{-3}$	1.6	Negatif

\*PCR reaksiyonuna 10 µl DNA eklenmiştir. 200 µl DNA 32.320 ookist içermektedir.

yine sulandırılarak, reaksiyonda 8:4:2 ookist içeren örneklerle PCR yöntemi yinelenildi. Reaksiyonda 8 ookist içeren örnek PCR ile pozitif, diğer örnek reaksiyonları negatif olarak belirlendi. Saptama limiti 8 ookist/reaksiyon olarak belirlendi. Saptama limitinin  $1\log_{10}$  katı (80 ookist/reaksiyon) yüksek pozitif,  $1\log_{10}$  katının yarısı da (40 ookist/reaksiyon) düşük pozitif olarak hesaplandı. Belirlenen bu örneklerle testin metot verifikasyonu için iki farklı analist ile doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapıldı (Şekil 4, 5).



Şekil 3. LOD çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri.



Şekil 4. Doğruluk çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri.

İkinci analistin doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait varyasyon katsayıları Tablo 3'te gösterilmektedir.

Metod verifikasyonu çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde Cumitech 31A, 2009 (12) referans alındı. Testlerin varyasyon katsayısının (%CV) %15'in altında olması yinelenbilirliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Her iki analist tarafından doğruluk

Tablo 2. Birinci analistin metot verifikasyon çalışma sonuçları.

	Doğruluk çalışması	Kesinlik çalışması (Çalışma içi)	Kesinlik çalışması (Çalışmalar arası)
Yüksek pozitif (%CV)	2.09	2.091	5.70
Düşük pozitif (%CV)	7.09	7.088	6.23
Negatif (%CV)	0.00	-	-

Tablo 3. İkinci analistin metot verifikasyon çalışma sonuçları.

	Doğruluk çalışması	Kesinlik çalışması (Çalışma içi)	Kesinlik çalışması (Çalışmalar arası)
Yüksek pozitif (%CV)	2.05	2.052	4.51
Düşük pozitif (%CV)	6.89	6.886	5.33
Negatif (%CV)	0.00	-	-

ve kesinlik çalışmaları yapıldı ve bu sonuçlara göre testin rutin hasta örneklerinin çalışılmasına uygun olduğuna karar verildi.

## TARTIŞMA

*Cryptosporidium*'un laboratuvar tanısı genellikle acid-fast boyama veya floresan antikor yöntemleri kullanılarak dışkıının mikroskopik incelemesiyle konulmaktadır<sup>(1)</sup>. Mikroskopinin uzun zaman alması, değerlendiren mikroskopistin deneyimli olmasının gerekmesi ve değerlendirmenin subjektif olması gibi dezavantajları vardır<sup>(13)</sup>. Mikroskopi kullanılarak yapılan saptama limiti çalışmaları değerlendirildiğinde,  $10^3$ - $10^7$  ookist/g dışkı şeklinde, oldukça farklı sonuçlar alındığı görülmektedir. Deneyimli bir mikroskopist acid-fast boyama yöntemi ile 50.000-500.000 ookist/g dışkı saptayabilmektedir<sup>(14)</sup>. Geleneksel saptama yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. PCR tabanlı yöntemler, az sayıda *Cryptosporidium*'un saptanması için oldukça duyarlı ve özgüldür, zaman ve maliyet açısından da etkilidir<sup>(15)</sup>. Ayrıca geleneksel yöntemler tür düzeyinde tanımlama yapamadığından, bu amaçla PCR, real-time PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), mikroarray, melting analizi, sekans analizi gibi moleküler yöntemler geliştirilmiştir<sup>(2)</sup>. Günümüzde bu nedenlerle moleküler yöntemlerle tanı koyan laboratuvarların sayısı artmaktadır.

Moleküler yöntemlerden realtime PCR'in en önemli avantajları "kapalı tüp" sistemiyle kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi ve daha az zaman almasıdır. Amplifikasyonun, reaksiyondan sonra elektroforez uygulanmadan, floresan kimyasallar kullanılarak gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlar<sup>(11,16)</sup>. Multipleks PCR yönteminin avantajları sonuç verme süresinin kısaltılması, duyarlılık ve özgüllüğün artırılması, örnek içerisinde tek bir reaksiyonla birden çok parazitin saptanmasına olanak vermesidir. Realtime PCR teknik personelin deneyiminin az olması, aşırı iş yükü, morfolojik olarak bozulmuş örnekler gibi insandan kaynaklanan hataları elimine etmektedir. Maliyetinin yüksek olması, floresan dalga boylarının birbirine çok yakın olması durumunda emisyon spektrumunun birbiri üzerine gelmesi ve yanlış kullanım nedeniyle örneğin, duyarlılığının azalması gibi dezavantajları vardır<sup>(13,16)</sup>.

Günümüzde *Cryptosporidium*'un tespiti için altın standart yöntem, saptama limiti  $\leq 10^3$  ookist/g dışkı olan PCR yöntemi olarak kabul edilmektedir<sup>(14)</sup>. Klinik numunelerde parazitlerin araştırılmasında moleküler yöntemlerin kullanımının giderek yaygınlaşması bu tekniklerin kullanımının standardize edilmesi gerekliliğini doğurmuştur<sup>(17)</sup>. İshal salgınlarının araştırılması amacıyla laboratuvarımıza, önemli bir ishal etkeni olan *Cryptosporidium* türlerinin saptanması için dışkı örnekleri gönderilmektedir. Tanı amacıyla mikroskopik yöntemler olan acid-fast boyama yöntemi ve DFA yöntemi kullanılmakta, ancak özellikle ishal salgını durumunda, ilgili birimlerin organizasyonu ve örneklerin toplanarak referans laboratuvara ulaştırılması zaman aldığı için ve örneklerin transportu sırasında zaman zaman uygun olmayan koşullara maruz kalabildikleri için parazitin morfolojisinin bozulduğu, bu nedenle mikroskopik tanının güçleştiği durumlarda moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Parazite ait ookistlerin duvar yapısının uygun bir DNA ekstraksiyonu yöntemiyle parçalanması, ardından kısa sürede ve güvenilir tanı konulması için konvansiyonel yöntemler yerine, hem standardizasyonun sağlanması hem de hızlı uygulanabilmesi açısından ticari kitle DNA ekstraksiyonu ve realtime PCR uygulanma-

sı yeğlenmiştir.

En sık görülen ishal etkenleri olan *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp.'nin her birinin tanısı için bu parazite özgü yöntemlerin rutin tanı laboratuvarına dâhil edilmesi zaman alıcıdır ve bir dışkı incelemesinin maliyetini artırmaktadır. Bu nedenle her üç etkenin belirlenmesi için multipleks realtime PCR yöntemleri geliştirilmiştir<sup>(18)</sup>. Gastrointestinal parazitlerin saptanmasına yönelik multipleks PCR kitlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, tanı performansının büyük ölçüde kullanılan yönteme ve hedeflenen patojen türlerine bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Test duyarlılığı/özgüllüğü, maliyeti, araştırılan hasta popülasyonu, laboratuvar iş akışı ve tanı algoritması gibi faktörler, en uygun multipleks PCR kitini seçerken dikkatle düşünülmesi gereken konulardır<sup>(19)</sup>. PCR'in altın standart yöntem olarak antijen testi ve singlepleks PCR'in birlikte kullanıldığı bir çalışmada, %88 duyarlılığa ve %98 özgüllüğe sahip olduğu belirlenirken, altın standart yöntem olarak mikroskopik incelemenin kullanıldığı bir çalışmada, özgüllüğünün %100 olduğu bildirilmiştir<sup>(13)</sup>. Çalışmamızda, *Cryptosporidium* spp.'nin yanısıra, önemli ishal etkenleri olan *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve nonpatojen kabul edilmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda, klinik bulgulara neden olduğu belirlenen *D. fragilis*'i birlikte saptayabilen ticari multipleks realtime PCR kiti kullanılmıştır. *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *D. fragilis*'in tanısı temel olarak direk mikroskopik inceleme ve trichrome yöntemleri ile konulabilmekte, *E. histolytica* tanısını desteklemek için ELISA yöntemi, *G. intestinalis* tanısını desteklemek için ise DFA yöntemi kullanılabilir. *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında direkt mikroskopi ve trichrome boyamanın değeri yoktur. Tanı temel olarak modifiye acid-fast boyama ile yapılabilmekte, DFA ile desteklenmektedir. Özellikle ishal olgularında bu etkenlere kısa sürede ve tek bir yöntemle tanı konulması istendiğinde PCR yöntemi yeğlenebilmektedir.

*Cryptosporidium*'un saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler SSUrRNA, *Cryptosporidium* ookist

duvar proteini (COWP), trombospondin ile ilişkili proteinler, 70 kDa ısı şok proteini (HSP70) ve aktin genleri dâhil olmak üzere genomun farklı bölgelerini hedef almaktadır<sup>(2,10)</sup>. SSU rRNA genine yönelik primerlerle realtime PCR yönteminin kullanıldığı çalışmalarda saptama limitinin 2-5 ookist/reaksiyon arasında değiştiği görülmektedir<sup>(3,10)</sup>. 18S rRNA geni hedef olarak kullanıldığında realtime PCR'ın saptama limitinin 10 ookist/reaksiyon olarak belirlendiği görülmektedir<sup>(5)</sup>. *Cryptosporidium* ookist duvar proteinine yönelik primerler kullanılarak *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp.'nin eşzamanlı tespiti için multiplex realtime PCR yönteminin uygulandığı bir çalışmada saptama limiti 100 ookist/reaksiyon olarak belirlenmiştir<sup>(18)</sup>. Çalışmamızda, ookist duvar proteinine yönelik primer kullanarak uyguladığımız yöntemin saptama limiti 8 ookist/reaksiyon olarak belirlenmiştir.

PCR yönteminin saptama limitinin belirlenmesinde genellikle DFA yöntemi<sup>(10)</sup> veya acid-fast boyama yöntemi<sup>(16)</sup> gibi mikroskopik yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların ağırlıklı olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra, araştırılan parazitin hedef bölgesinin klonlanması yönteminin kullanıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır<sup>(20)</sup>. Çalışmamızda, yaptığımız deneyler sonucunda modifiye acid-fast boyama yönteminin parazitin saptanmasına olanak vermesine rağmen, parazit sayımı için DFA yöntemi kadar başarılı olamadığı görülmüştür. Bu nedenle PCR'ın saptama limitini belirlemek için parazit sayımı DFA yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda, benzer PCR teknikleri kullanılmasına rağmen elde edilen saptama limitlerinin farklı olmasının nedenleri çalışılan örnek matriksi, matriks içindeki hedef mikroorganizmayı sayma yöntemi, kullanılan DNA ekstraksiyonu yöntemi, PCR uygulamalarında kullanılan primerlerin hedef gen bölgeleri ve kullanılan reaktiflerin farklı olması, testin optimize edilip edilmemiş olması, PCR reaksiyonunun gerçekleştirildiği cihazların farklı olması gibi birçok faktör rol oynamaktadır.

Metod verifikasyonu, bir laboratuvarın bir yöntemi/testi değerlendirerek onayladığı ve belirli kullanımlar için özel şartların yerine getirildiğine dair objektif kanıtlar sağlayan bir işlemdir. Yöntemin, bir veya daha fazla matriks içerisindeki bir etkeni, bir veya daha fazla cihazda veya platformda belirleyip, tanımlayabildiğini göstermeyi sağlar<sup>(20)</sup>. Moleküler yöntemlerin uygulanmasında en iyi amplifikasyon eğrisi veya PCR ürünü bandını veren sonuçların elde edilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılarak yöntemin geliştirilmesi ve standardize edilmesi gereklidir. Inhouse PCR yönteminin amplifikasyon aşamasının optimizasyonunda en çok dikkat edilmesi gereken aşamalar uygun bağlanma ısısı, optimal MgCl<sub>2</sub> ve primer-prob konsantrasyonunun belirlenmesidir. Ticari kitler, kullanıma hazır olmaları ve optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra kullanıma sunulmaları nedeniyle günümüzde birçok laboratuvar tarafından yeğlenmektedir. Ancak kullanılan cihazlar ve örnek matriksleri farklılıkları gibi nedenlerden dolayı test sonuçları etkilenmekte, bu nedenle her laboratuvar tarafından rutin laboratuvar içi uygulamaları için saptama limitinin belirlenmesi ve yeniden optimize edilmesi gerekmektedir.

Rutin hizmet veren laboratuvarlarda duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, optimize edilmiş ticari kitlerin kullanımının, rutin mikroskopik inceleme ile saptanamayan veya gözden kaçırılabilen parazitlerin tanısında halk sağlığına önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Vejdanih M, Mansour R, Hamzavi Y, Vejdani S, Nazeri N, Michaeli A. Immunofluorescence assay and PCR analysis of *Cryptosporidium* oocysts and species from human fecal specimens. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(6): e10284. <https://doi.org/10.5812/jjm.10284>
2. Rolando RFR, da Silva S, Saramago Peralta RH, et al. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(4):476-9. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000400006>
3. Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation

- of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2335-8.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2335-2338.2002>
4. Amar CFL, Dear PH, McLauchlin J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. Lett Appl Microbiol. 2004;38(3):217-22.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01473.x>
  5. Adamska M, Leońska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak B. PCR and real time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst DNA. Folia Biol (Kraków). 2011;59(3-4):115-20.  
[https://doi.org/10.3409/fb59\\_3-4.115-120](https://doi.org/10.3409/fb59_3-4.115-120)
  6. Burnet JB, Ogorzaly L, Tissier A, Penny C, Cauchie HM. Novel quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. J Appl Microbiol. 2012;114(4):1211-22.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12103>
  7. Aksoy U, Akisu C, Sahin S, et al. First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. Euro Surveill. 2007;12(2):E070215.4.  
<https://doi.org/10.2807/esw.12.07.03142-en>
  8. Usluca S, Aksoy U. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic stools by PCR/RFLP analyses. Turk J Med Sci. 2011;41(6):1029-36.  
<https://doi.org/10.3906/sag-1003-720>
  9. Usluca S, Aksoy Ü. Su kaynaklı bir parazit: *Cryptosporidium*. DEÜ Tıp Fak Derg. 2006;20(1):65-74.
  10. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. J Clin Microbiol. 2011;49(3):918-24.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01733-10>
  11. Soliman RH, Othman AA. Evaluation of DNA melting curve analysis real-time PCR for detection and differentiation of *Cryptosporidium* species. Parasitol United J. 2009;2(1):47-54.
  12. Clark RB. Cumitech 31A: Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Coordinating ed., SE Sharp. ASM Press, Washington, ABD; 2009.
  13. Bian L. Validation of multiplex real-time PCR tests for intestinal parasites. Bölüm tezi, Texas Üniversitesi, ABD; 2013.
  14. Crannell ZA, Castellanos-Gonzalez A, Irani A, Rohrman B, White AC, Richards-Kortum R. Nucleic acid test to diagnose cryptosporidiosis: lab assessment in animal and patient specimens. Anal Chem. 2014;86(5):2565-71.  
<https://doi.org/10.1021/ac403750z>
  15. Köken E. Detection and quantification of *Cryptosporidium parvum* in natural soil matrices and leachates using qPCR. MSc Tezi, Illinois Üniversitesi, Şikago, ABD; 2012.
  16. Tanriverdi S, Tanyeli A, Başlamışlı F, et al. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3237-44.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3237-3244.2002>
  17. Couto MCM, Sudre AP, Lima MF, Bomfim TCB. Comparison of techniques for DNA extraction and agarose gel staining of DNA fragments using samples of *Cryptosporidium*. Vet Med-Czech. 2013;58(10):535-42.  
<https://doi.org/10.17221/7085-VETMED>
  18. Haque R, Roy S, Siddique A, et al. Multiplex real-time pcr assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. Am J Trop Med Hyg. 2007;76(4):713-7.
  19. Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis/parvum*, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. PLoS One. 2019;14(4):e0215068.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215068>
  20. Hawash Y, Ghonaim MM, Al-Hazmi AS. Internal amplification control for a *Cryptosporidium* diagnostic PCR: construction and clinical evaluation. Korean J Parasitol. 2015;53(2):147-54.  
<https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.2.147>
  21. Guidelines for the validation of analytical methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds, 2nd Ed., US Food & Drug Administration Office of Foods and Veterinary Medicine, 2015.

# Vajinal Floradan İzole Edilen *Lactobacillus* sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması

## *Investigation of Antibiofilm Activities of Lactobacillus sp. Metabolites Isolated from Vaginal Flora*

Müjde Eryılmaz\*<sup>✉</sup>, Didem Kart\*\*<sup>✉</sup>, Suna Sibel Gürpınar\*<sup>✉</sup>

\*Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

\*\*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada, vajinal kültürlerden izole edilen *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmleri üzerindeki antibiyofilm aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmada, önceden 16S rRNA dizi analizi ile identifikasyonları yapılmış olan 20 adet *Lactobacillus* sp. izolatu kullanılmıştır. İzolatların metabolitlerinin antibiyofilm aktiviteleri *P. aeruginosa* üzerine mikropalak temelli antibiyofilm yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak steril De Man-Rogosa Sharpe Broth besiyeri kullanılmıştır.

**Bulgular:** Test edilen metabolitlerin tamamı *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı antibiyofilm aktivite göstermiştir. Metabolitler arasında fark olmakla birlikte, biyofilm hücre sayısında en az 4 logaritma (kob/ml) azalış saptanmıştır. En iyi antibiyofilm aktivite *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus jensenii* metabolitleri için saptanmış olup, bunlar *P. aeruginosa* biyofilm hücrelerinin tamamını yok edebilmiştir.

**Sonuç:** Patojen bakterilerin planktonik formlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler, biyofilm içindeki bakterilerin eradikasyonunda çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Vajinal *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin göstermiş olduğu iyi antibiyofilm aktivite, bu metabolitlerin biyofilm ilişkili enfeksiyonlar ile mücadelede alternatif ajanlar olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Lactobacillus* sp., metabolit, antibiyofilm aktivite

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to investigate the antibiofilm activities of metabolites produced by vaginal *Lactobacillus* sp. against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

**Method:** In this study, 20 *Lactobacillus* sp. isolates which were previously identified by 16S rRNA gene sequence analysis were used. Antibiofilm activity of the metabolites of the isolates was determined by using microplate-based antibiofilm method on *P. aeruginosa*. De Man-Rogosa Sharpe Broth was used as negative control.

**Results:** All tested metabolites showed statistically significant antibiofilm activity on *P. aeruginosa* biofilms. Although there were differences between the metabolites, the number of biofilm cells decreased at least 4 logarithms (cfu/ml). The best antibiofilm activity was determined for *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus jensenii* metabolites that destroyed all *P. aeruginosa* biofilm cells.

**Conclusion:** Antibiotics commonly used in the treatment of planktonic forms of pathogenic bacteria are often insufficient for the eradication of bacteria in the biofilm. Good antibiofilm activity demonstrated by vaginal *Lactobacillus* sp. metabolites suggests that these metabolites can be used as alternative agents to help combat against biofilm-associated infections.

**Keywords:** *Lactobacillus* sp., metabolite, antibiofilm activity

### Alındığı tarih:

16.07.2019

### Kabul tarihi:

15.08.2019

### Yayın tarihi:

30.09.2019

### ORCID Kayıtları

M. Eryılmaz 0000-0003-3760-1996

D. Kart 0000-0001-7119-5763

S. S. Gürpınar 0000-0003-4244-0920

✉ meryilmaz@ankara.edu.tr

## GİRİŞ

Biyofilmler, canlı ya da cansız yüzeylere ve birbirlerine tutunabilen, ekstraselüler polimerik yapıdaki matris içine gömülü hücrelerden oluşan sesil mikroorganizma topluluklarıdır. Bu topluluk içinde yer alan mikroorganizmalar üreme, gen ekspresyonu ve protein üretimi açısından farklı fenotipik özellikler gösterebilirler. Biyofilm içinde yaşayan mikroorganizmanın, üretmiş olduğu polimerik yapılar sayesinde etrafı çevrelenir ve kendini bir matris içine gömerek planktonik formlara kıyasla olumsuz birçok koşul karşısında avantaj sağlar. Örneğin, konak immün sistemi ve antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençlidir, bu da biyofilm ilişkili enfeksiyonların eradikasyonunu zorlaştırmaktadır<sup>(1-5)</sup>.

Biyofilm, ilk kez Antonie Van Leeuwenhoek tarafından 17. yüzyılda dişinde oluşan plakta gösterilmiş ve animalcules olarak adlandırılmıştır. Günümüzde özellikle kateterler, implantlar, yapay kalp kapakçıkları, eklem replasmanları, kontakt lensler gibi cansız yüzeylerde görülmekte ve tedavisi güç enfeksiyonlara yol açarak morbidite ve mortalite oranlarında artışa neden olmaktadır<sup>(2,4)</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa*, doğada yaygın olarak bulunan, özellikle immünsupresif hastalarda pnömoni, bakteriyemi, menenjit, beyin apsesi, endokardit, septik artrit, osteomyelit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi klinik tablolara neden olan non-fermentatif Gram negatif bir basildir. Özellikle biyofilm ilişkili hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmekte ve tedavisinde sorun yaşanmaktadır. Araştırmacılar, biyofilm oluşumunun hastane enfeksiyonlarının ortaya çıkışındaki etkin rolleri ve antimikrobiyallerle kontrol altına alınmalarında yaşanan zorluklar nedeniyle alternatif antibiyofilm ajanları araştırmaya yönelmişlerdir<sup>(6)</sup>. Özellikle hastanelerde ciddi sorun oluşturan *P. aeruginosa* biyofilmlerinin yok edilmesi için acilen yeni antibiyofilm etkili maddelere gereksinim duyulmaktadır.

Laktobasiller insanlarda normal flora üyesi olarak ağızda, vajinada ve bağırsaklarda bulunurlar<sup>(7)</sup>. Ürettikleri laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi metabolitler ve antagonizma etkileri sayesinde bu bölgelerde koruyucu olarak görev yaparlar<sup>(8,9)</sup>. Menopoz öncesi sağlıklı kadınlarda vajinada dominant olarak bulunarak patojen mikroorganizmaların kolonize olmasına engel olurlar<sup>(10)</sup>. Son yıllarda flora üyesi mikroorganizmaların organizma üzerindeki olumlu etkilerini bildiren çalışma sayısı artmış ve hastalıkların tedavisinde alternatif olarak kullanılıp kullanılmayacakları araştırmalara konu olmuştur<sup>(9,11-14)</sup>.

Bu çalışmanın amacı, vajinal kültürlerden izole edilmiş olan *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerindeki antibiyofilm aktiviteilerinin araştırılmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Lactobacillus** sp. İzolatlarının İdentifikasyonu: Çalışmada, Mayıs 2016-Mayıs 2017 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan, Cebeci Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen vajinal kültürlerden izole edilmiş ve önceden 16S rRNA dizi analizi ile identifikasyonları yapılmış olan 9 adet *Lactobacillus gasseri*, 3 adet *Lactobacillus crispatus*, 3 adet *Lactobacillus jensenii*, 3 adet *Lactobacillus fermentum*, 1 adet *Lactobacillus vaginalis* ve 1 adet *Lactobacillus helveticus* izolatı kullanılmıştır<sup>(9)</sup>.

**Metabolit Eldesi:** *Lactobacillus* izolatlarının, Rogosa Agar'daki 24-48 saatlik kültürlerinden 5 ml De Man-Rogosa Sharpe (MRS) Broth (pH 6.5) (Merck, Almanya) besiyeri içeren tüplere ekim yapılmış ve 37 °C'de 72 saat, anaerobik koşullarda inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bakteri hücrelerini uzaklaştırmak için bakteri kültürleri 12.000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş, daha sonra supernatantlar 0.45 µm por çaplı steril membran filtrelerden geçirilmiştir<sup>(9,15)</sup>.

### ***Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Oluşumu:**

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu beyin kalp infüzyon (Brain Heart Infusion, BHI) besiyeri içinde 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür 590 nm'de OD 0.5 olacak şekilde spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve son inokulum konsantrasyonu 10<sup>6</sup> kob/mL'e ayarlanmıştır. Her bir test koşulu için bu inokulum süspansiyonundan 100'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının 12 çukuru boyunca eklenmiştir. İnoküle edilen plaklar 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra çukurlardaki besiyeri dışarı atılarak her çukura yeniden 100'er µl fosfat tamponu eklenmiş ve tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra, plaklar 20 saat inkübasyona bırakılmış ve olgun biyofilm oluşumları sağlanmıştır<sup>(16)</sup>.

### ***Lactobacillus* sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm**

**Aktivitelerinin Araştırılması:** *Lactobacillus* sp. metabolitlerinden 100'er µl alınarak *P. aeruginosa* olgun biyofilmlerini içeren çukurlara aktarılmış ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril MRS sıvı besiyeri (100 µl) kullanılmıştır. Süre sonunda plaklar 5 dakika vortekslenip sonrasında 5 dakika sonikasyon işlemine 3 defa maruz bırakılarak hücrelerin çukurlardan ayrılması sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra biyofilm hücreleri steril bir tüp içine aktarılmış ve hücrelerin sayımı için Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine ekilmiş, tüm deneyler paralel olarak üç kez yinelenmiştir<sup>(16)</sup>.

**İstatistiksel Veri Analizleri:** İstatistiksel veri analizleri SPSS programı (Ver.23, Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Kontrol ve test gruplarının karşılaştırılmasında Student's t-test yöntemi kullanılmıştır. Gruplar arasında p-değeri <0.05 olarak gözlenen farklılıklar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

**Taramalı Elektron Mikroskop (TEM) Analizi:** TEM analizi için *P. aeruginosa* olgun biyofilmleri cam slaytlar üzerinde yukarıda bahsedilen koşullar altında

oluşturulmuş ve %2 gluteraldehit ve 0.1 M kakodilat içeren tampon solüsyonu ile örnekler 30 dakika boyunca fikse edilmiştir. Seri alkol solüsyonlarından geçirilen örnekler oda ısısında kurutulduktan sonra Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılarak altın-palladyum kaplama işlemine tabi tutulmuş ve elektron mikroskopu ile incelenmiştir<sup>(17)</sup>.

## **BULGULAR**

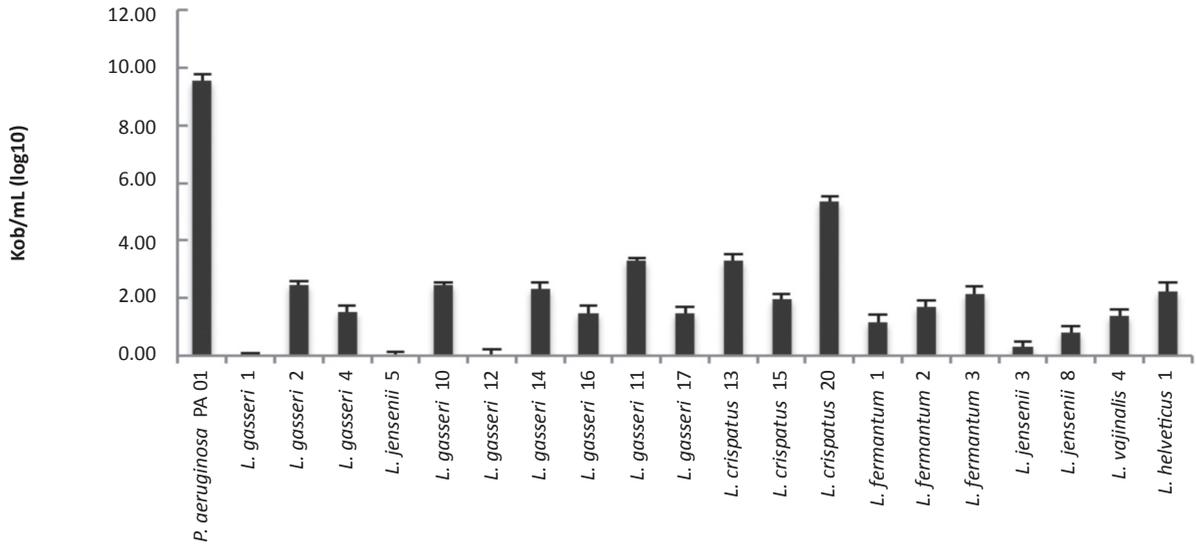
### ***Lactobacillus* sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm Aktivite Sonuçları ve Biyofilm Hücrelerinin TEM**

**Analizi:** *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *P. aeruginosa* biyofilm hücreleri üzerine etkisi mikropalak temelli antibiyofilm yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında test edilen izolatların tamamının metabolitleri *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı antibiyofilm aktivite göstermiştir (p<0.05). Metabolitler arasında fark olmakla birlikte, biyofilm hücre sayısında en az 4 logaritma (kob/ml) azalış saptanmıştır. En iyi antibiyofilm aktivite *L. gasseri* ve *L. jensenii* metabolitleri için saptanmış olup, bunlar *P. aeruginosa* biyofilm hücrelerinin tamamını yok edebilmiştir (Grafik 1).

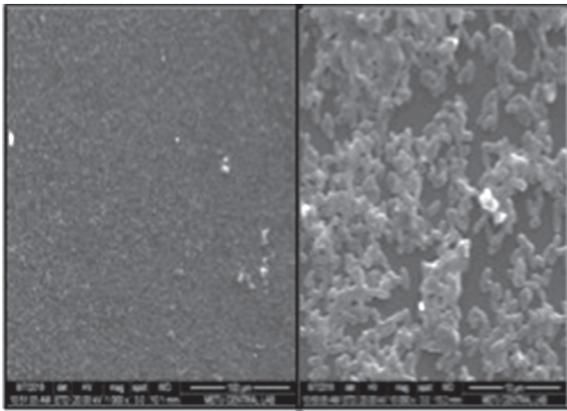
Olgun biyofilm oluşumunun hemen sonrasında taramalı elektron mikroskopu ile biyofilm oluşumu görüntülenmiş ve iki farklı büyütmede de birbirine tutunmuş yoğun biyofilm hücre popülasyonu gözlenmiştir (Resim 1).

## **TARTIŞMA**

Biyofilm içindeki bakteriler, fiziksel ve kimyasal bariyer nedeniyle antimikrobiyal penetrasyonunda azalma, genel stres yanıtı olarak metabolizma ve çoğalma hızında yavaşlama, mikrobiyal heterojenite ve direnç genlerinin aktarımı gibi nedenlerden dolayı antimikrobiyal ajanlara, konakçı immun sistemine ve sıcaklık gibi dış etkenlere karşı planktonik formlara kıyasla daha dirençlidirler. Bu bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisi oldukça güçtür<sup>(2,18)</sup>.



Grafik 1. *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm hücreleri üzerindeki antibiyofilm aktivitesi (kob/ml).



Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm hücrelerinin TEM görüntüsü (x1000 - x10000).

Günümüzde var olan kimyasal ajanlar biyofilmlerle mücadelede yetersiz kalmakta ve bu konuda etkili olabilecek yeni stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Bu açıdan çalışmamız, son yıllarda araştırmacıların oldukça fazla ilgisini çeken flora bakterisi metabolitlerinin antibiyofilm aktivitelerini araştırması açısından önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerinde test edilen tüm *Lactobacillus* metabolitleri, hücre sayılarında yüksek oranda azalma yol açarak istatistiksel olarak anlamlı, oldukça etkin antibiyofilm aktivite göstermiştir. *L. gasseri* ve *L. jensenii* metabolitleri,

*P. aeruginosa* biyofilm hücrelerinin tamamını yok ederek en iyi antibiyofilm aktiviteyi gösteren izolatlar olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, vajinal ve süt ürünü örneklerinden izole edilmiş *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *Escherichia coli* üzerindeki antibiyofilm etkisi araştırılmış olup, tüm metabolitlerin antibiyofilm aktivite gösterdikleri görülmüştür. Suşlar arasında farklılıklar olmakla birlikte, vajinal izolatların metabolitlerinin, süt ürünlerinden izole edilen laktobasil metabolitlerine kıyasla daha iyi antibiyofilm etki gösterdikleri bildirilmiştir. En iyi antibiyofilm aktivite gösteren bu vajinal izolatlar, *L. gasseri* ve *L. fermentum* olarak tanımlanmıştır<sup>(19)</sup>. Bir başka çalışmada, Osama ve ark.<sup>(20)</sup> *Lactobacillus rhamnosus* EMCC 1105 ve *L. gasseri* EMCC 1930 suşlarının metabolitlerinin biyofilm ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak en sık karşılaşılan patojenler olan *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibiyofilm etkilerini araştırmış, her iki *Lactobacillus* sp. suşunun metabolitlerinin de üç test bakterisinin biyofilm oluşumunu etkili şekilde inhibe ettiğini görmüşlerdir. *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin biyofilm ilişkili enfeksiyonlarla mücadelede umut verici olabileceği bildirilmiştir. Her iki çalışmada da belirtildiği gibi bizim çalışmamızda da en iyi etkiyi gösteren izolatlardan biri *L. gasseri* türüne aittir.

Khiralla ve ark.<sup>(21)</sup> çalışmalarında, fermente süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus pentosus* ve *Lactobacillus plantarum* metabolitlerinin *P. aeruginosa* ve *Bacillus cereus* biyofilmlerinin oluşumunu anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir. İzolatların kaynağının ev yapımı süt ürünleri olduğu başka bir çalışmada da izole edilen laktobasil metabolitlerinin *Bacillus subtilis* ve *E. coli* K-12 ko-kültürlerinin oluşturduğu biyofilmler üzerindeki aktivitesi araştırılmış ve en iyi antibiyofilm etkiyi *L. plantarum* L32 metabolitinin gösterdiği bildirilmiştir<sup>(22)</sup>.

Shokri ve ark.<sup>(23)</sup>, süt ürünlerinden izole ettikleri *L. fermentum* metabolitlerinin antibiyotik dirençli *P. aeruginosa* suşları üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm etkili olduklarını göstermişlerdir. Çalışmamızda, *L. fermentum* metabolitlerinin tamamının *P. aeruginosa* biyofilmi üzerinde inhibe edici etkisi olduğu görülmüştür. Ancak, çalışmada kullanılan *L. fermentum* metabolitlerinin *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal aktivitesi saptanmamıştır<sup>(9)</sup>. Yapılan çalışmalar laktik asit bakterilerinin antibiyofilm aktivitesinden çeşitli mekanizmaların sorumlu olabileceğini göstermektedir. Bu mekanizmalar, ürettikleri laktik asit ve antimikrobiyal peptidler gibi metabolitlerle bakterilerin çoğalmasını inhibe etmeleri, ürettikleri biosurfaktanlarla hücre yüzey özelliklerini değiştirerek biyofilm oluşumunda ilk basamak olan bakteriyel tutunmayı zayıflatmaları, hücreler arasındaki agregasyon ve yüzeye tutunma süreçlerini etkileyerek biyofilm bütünlüğünün bozulmasına neden olmaları olarak sıralanabilir. Bunun yanı sıra laktik asit bakterileri tarafından salınan ekzopolisakaritler ve hücre yüzeylerinin fizikokimyasal özellikleri de bu etkiden sorumlu tutulabilir. Antibiyofilm etkide rol oynayan bu mekanizmalar izolata bağlı olarak farklılıklar gösterebilir<sup>(20)</sup>.

Farklı kadınların gebelik, cinsel olarak aktif olma, menstürasyon, sigara kullanımı, yaş, temizlik alışkanlıkları ve antimikrobiyal ajan kullanımları gibi durumları göz önüne alındığında vajinal floralarının farklı olabileceği ve florada bulunan mikroorganizmaların ortam koşullarından etkilenecek farklı metabolit içe-

riğine sahip olabileceği bilinmektedir<sup>(15)</sup>. Bu durum sonucunda ortaya çıkabilecek değişik metabolit içeriğinin, *Lactobacillus* türlerinin farklı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite sergilemelerine neden olabileceği düşünülebilir.

Yapılan çalışmalar, *Lactobacillus* türlerinin *P. aeruginosa* kaynaklı biyofilmlerle mücadelede günümüzde kullanılan antibiyotikler veya biyositler gibi çeşitli antimikrobiyal ajanlara alternatif olarak kullanılabilir veya bu ajanlar ile kombine kullanılabilir doğal antibiyofilm ajanları olabileceklerini düşündürmektedir. Çoklu ilaç dirençli patojenlere karşı *Lactobacillus* türleri gibi biyolojik kökenli kontrol ajanlarının belirlenmesi, ilaç direnci ile mücadele açısından da oldukça önem taşımaktadır. Bu açıdan daha geniş örnek aralığına sahip çalışmalar planlanarak iyi antimikrobiyal ve antibiyofilm etki gösteren izolatların eldesi sağlanmalı ve tedavide alternatif olarak kullanılabilir yeni farmasötik ürünlerin geliştirilmesi amaçlanmalıdır.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 17H0237011) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Algburi A, Comito N, Kashtanov D, Dicks LMT, Chikindas ML. Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(3):e02508-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16>
2. Beğendik F. Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyolojide biyofilm. *Flora.* 2003;8(4):271-7.
3. Corte L, Pierantoni DC, Tascini C, Roscini L, Cardinali G. Biofilm specific activity: A measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms.* 2019;7(3):73. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030073>
4. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2018;48(1):1-13. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.001>
5. Willke Topçu A. Biyofilm nedir? In: Sakarya S (ed.) "Türkiye Klinikleri Enfeksiyon Hastalıkları" kitabında. Türkiye: Ankara, 2018:1-3.
6. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for

- combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522-54.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
7. Davoodabadi A, Dallal MMS, Lashani E, Ebrahimi MT. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(12):1-6.  
<https://doi.org/10.5812/jjm.27852>
  8. Kılıç E, Aslım B. Laktik asit bakterilerinin vajen florasındaki önemi ve probiyotik olarak kullanımı. *OrLab On-line Mikrobiyoloji Dergisi*. 2003;1(2):70-82.
  9. Eryılmaz M, Gürpınar SS, Palabıyık IM, Guriz H, Gerçeker D. Molecular identification and antimicrobial activity of vaginal *Lactobacillus* sp. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(15):1241-7.  
<https://doi.org/10.2174/1389201020666190110164123>
  10. Kovachev S. Defence factors of vaginal lactobacilli. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44:31-9.  
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1306688>
  11. Bashiardes S, Tuganbaev T, Federici S, Elinav E. The microbiome in anti-cancer therapy. *Semin Immunol*. 2017;32:74-81.  
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.04.001>
  12. Dimitonova SP, Danova ST, Serkedjieva JP, Bakalov BV. Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women. *Anaerobe*. 2007;13:178-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.08.003>
  13. Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell*. 2018;33(4):570-80.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.015>
  14. Sgibnev AV, Kremleva EA. Vaginal protection by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacilli*. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(10):e22913.  
<https://doi.org/10.5812/jjm.22913>
  15. Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*. 2014;196(9):645-53.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-1003-1>
  16. Kart D, Tavernier S, Van Acker H, Nelis H.J, Coenye T. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*, Biofouling. 2014;30(3): 377-83.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2013.878333>
  17. Wang L, Dong M, Zheng J, et al. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod*. 2011;37(5):631-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.006>
  18. Hançer Aydemir D. Bakteriyal biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri. *Turk J Life Sci*. 2018;3(1):218-30.
  19. Vacheva A, Georgieva R, Danova S, et al. Modulation of *Escherichia coli* biofilm growth by cell-free spent cultures from lactobacilli. *Cent Eur J Biol*. 2012;7(2): 219-29.  
<https://doi.org/10.2478/s11535-012-0004-9>
  20. Osama DM, Elkhatib WF, Tawfeik AM, Aboulwafa MM, Abdel-Haleem Hassouna N. Antimicrobial, antibiofilm and immunomodulatory activities of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus gasseri* against some bacterial pathogens. *Int J Biotechnol Wellness Ind*. 2017;6(1):12-21.  
<https://doi.org/10.6000/1927-3037.2017.06.01.2>
  21. Khiralla GM, Mohamed EAH, Farag AG, Elhariry H. Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens. *J Biotech Res*. 2015;6:86-95.
  22. Ganchev I. Antibiofilm activity of *Lactobacillus* strains. *Sci J Chem*. 2018;6(5):77-82.  
<https://doi.org/10.11648/j.sjc.20180605.11>
  23. Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M et al. The inhibition effect of *Lactobacilli* against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017;10(1):34-42.  
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9267-9>

# YAZARLARA BİLGİ

- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin yayın organı olup ilgili alanlardaki özgün araştırma, derleme, olgu sunumu, bilimsel haberler, bilimsel kitap ve dergi tanıtım yazıları ile okuyucu mektuplarını yayımlayan hakemli bir dergidir.
- Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık olmak üzere üç ayda bir çıkar ve dört sayıda bir cilt tamamlanır.
- Yazılar Türkçe olarak yollanmalıdır.
- Yazıların sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yayımlanması istenen metnin dayandığı çalışma, daha önce bir yerde yayımlanmamış ya da yayımlamak üzere teslim edilmiş veya kabul edilmiş olmamalıdır. Özet biçiminde yayımlanmış bir ön bildirin bitmiş biçimine yer verilebilir.
- Dergiye gönderilen yazılar, ilk olarak dergi standartları açısından incelenir. Derginin istediği forma uymayan yazılar, daha ileri bir incelemeye gerek görülmezsizin yazarlarına iade edilir. Bu nedenle gereksiz yere zaman ve emek kaybına yol açılmaması için, yazı sahipleri dergi kurallarını dikkatli incelemek zorundadır.
- Dergi kurallarına uygunluğuna karar verilen yazılar Danışma Kurulundan veya konu ile ilgili kişilerden en az iki hakeme gönderilir ve hakemlerden yayına uygun olup olmadığı konusunda görüşleri alınır. Düzeltme isteniyorsa tekrar yazara gönderilir. Bu incelemeden geçen yazılar, Yayın Kurulu tarafından tekrar değerlendirilir ve basılacağı yer ve sayı kararlaştırılır.
- Danışma ve Yayın Kurulları; düzeltme, kontrol ve dizgi aşamasında yayıncı, yazılarda düzeltme yapmak, biçiminde değişiklikler istemek ve yazarları bilgilendirerek kısaltma yapmak yetkisine sahiptir. Yazarlardan istenen değişiklik ve düzeltmeler yapıldıkça kadar, söz konusu yazılar yayın programında sırada bekletilir.
- Teslim edilmiş bir metnin tümünün veya bir bölümünün bir başka yerde yayımlanması söz konusu olursa editörlere bilgi verilmesi zorunludur.

## Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Tüm yazarların ORCID numaraları başvuru esnasında on-line olarak ilgili alana eklenmelidir. ORCID ID kaydı için <https://orcid.org> adresini kullanınız. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve teklif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak veya posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.
- İnsanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalarla ilgili olarak etik kurulların onaylarının ve gönüllülerden alınmış yazılı onam formlarının da on-line olarak ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.

## Prof. Dr. Çağrı Ergin

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Kınıklı Kampüsü / Denizli  
Tel: 0258 296 2491  
E-posta: tmcdditor@gmail.com

## Metin Çeşitleri

- Metin çeşitlerinde on-line olarak yönlendirme bulunmaktadır.
- **Özgün Araştırma:** Gerekli ve uygun sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 250 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; Türkçe ve İngilizce 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- **Derleme:** 1-4 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 200 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce Özetler; 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- **Olgu Sunumu:** Yeterli sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 20 kaynak; 200 sözcüğü geçmeyen İngilizce-Türkçe Özet; 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- **Editöre Mektup:** Daha önce yayımlanmış olan bir yazı hakkında, yeni bir araştırma bulgularının bildirilmesi veya bir görüş bildirimini olabilir. Bir şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik ve en çok 5 kaynak içerebilir.

## Metin yazımı esnasında uyulacak kurallar

- Yazının Türkçe başlığı kısa, açık ve içeriği tam yansıtır olmalıdır.
- Yabancı dilde başlık Türkçe başlık ile birebir uyummalıdır.
- On-line ilgili formlarda tüm aşamalar doldurulmalıdır
- Araştırma daha önce bir bilimsel toplantıda bildiri (sözlü veya poster) olarak sunulmuş ise, bu bilgi toplantının adı ve tarihiyle birlikte belirtilmelidir.
- Olgu sunumu, derleme, editöre mektup gibi diğer metin çeşitlerinde bölümlü özet hazırlamaya gerek yoktur.
- Özet bölümünde kısaltmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalı ve kaynak, şekil, tablo ve atıf yer almamalıdır.
- Ana metin sayfaları, metin çeşidine göre bölümlendirilmelidir. Özgün araştırmalar amacın belirtildiği giriş, gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma kısımlarından oluşmalıdır. Bulgu ve tartışmanın kısa olduğu metinlerde iki başlık birleştirilerek de aktarılabilir. Olgu sunumu amacın belirtildiği kısa bir girişten sonra detaylı olgu ve tartışmadan oluşmalıdır. Derlemelerde önce kısa bir giriş yapılmalıdır ve ardından derlemenin konusuna uygun oluşturulmuş bölümleri kapsmalıdır.
- Mikroorganizma adları ve MİK veya PFGE gibi kısaltmalar ilk kullandıklarında tam olarak, açık şekilleriyle yazılmalı mikroorganizma adı daha sonraki kullanımlarda cins adının ilk harfi kullanılarak kısaltılmalıdır. *Staphylococcus aureus S. aureus* gibi. Paragraf başında ise bu kısaltma kullanılmamalı, isim tam olarak yazılmalıdır.
- *Escherichia coli* ve *Entamoeba coli* gibi, kısaltmaları aynı olacak adlar aynı yazıda geçtiğinde yazı boyunca kısaltılmadan kullanılmalıdır. Stafillokok, streptokok gibi sadece cins adı geçen cümlelerde dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir.
- Yanında birim gösterilmeyen ondan küçük sayılar yazı ile yazılmalı, rakam ile yazılan sayılara takılar kesme işareti ile eklenmelidir. Üç hasta suşların 28'i gibi. Mümkün olduğunca cümlelere sayılarla başlanmamalıdır.
- Boyama yöntemi olan Gram büyük harfle yazılmalıdır. Bakteri tanımlamasında ise küçük harf kullanılmalıdır. Örneğin gram negatif kok yazılmalıdır. Negatif / pozitif kelimeleri açık olarak yazılmalı; (-) veya (+) kısaltmaları kullanılmamalıdır.

- Bir teşekkür yazısı varsa Kaynaklar'dan önce olmalıdır.
- Çalışma kazanılmış bir burs veya proje ile tamamlanmışsa belirtilmelidir.
- Kaynaklar listesinde yer alan kaynakların tamamının metin içinde kullanılmış olması gereklidir.
- Kaynaklar metin içinde geçiş sırasına göre sıralanmalı ve metin içinde cümle sonuna konacak parantez içine, üst simge olarak yazılmalıdır. Örneğin; ..... gösterilmiştir<sup>(1,5,6)</sup>.....Kaynak yazımı sırasında boşluk bırakmayınız.
- Metinde kaynaklar üst simge olarak bulunmalıdır.
- Metinde kaynak verilirken yazar adı kullanılıyorsa kaynak numarası yazar adının yanına yazılmalıdır. Örneğin; Smith ve Gordon'a<sup>(4)</sup> göre ..... Kaynak yazımı sırasında boşluk bırakmayınız.
- Henüz yayınlanmamış veriler ve çalışmalar Kaynaklar bölümünde yer almamalıdır.
- Dergimiz, başka çalışmalarda bildirilen kaynakların aktarma şeklinde kullanılmasını kabul etmemektedir. Yazarlar tarafından doğrulanmayan kaynaklara bağlı olarak çalışma değerlendirme dışı bırakılabilir.
- Kaynaklarda, yazar sayısının altı veya daha az olması durumunda tüm yazarların isimleri yazılmalıdır. Yazar sayısının altıdan fazla olması durumunda ise ilk üç yazarın ismi yazılmalı, sonrasında Türkçe makalelerde "ve ark.", İngilizce makalelerde ise "et al." ilave edilmelidir.
- Dergi isimlerinin kısaltılması Index Medicus'taki stile uygun olarak yapılmalıdır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/>). Index Medicus'ta bulunmayan dergi adları kısaltılmadan yazılmalıdır.
- Dergide kaynaklar yazılırken temel olarak Türkçe'ye uyarlanmış Vancouver yazım stili (Örnekler aşağıdadır) esas alınmalı; noktalamalar, kelime ve harf aralıkları, büyük harfler, dergi ve cilt numarası buna göre düzenlenmelidir.

## Örnekler

### A. Makaleler

Kaynak yazımlarında italik, boşluk, noktalama işaretleri kullanımına kesinlikle dikkat ediniz.

- **Standart Dergi Makalesi:** Standart Dergi Makalesi: Courvalin P, Davies J. Mechanisms of resistance to aminoglycosides. Am J Med. 1977;62(6):868-72. doi:.....
- **Dergi Ekinde (Supplement) yer alan makale:** Snyderman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. Chest. 2003;123(Suppl 5):S500-3. doi:.....
- **Elektronik dergi makalesi:** Lam PV, Tadros M, Fong IW. Mandibular osteomyelitis due to *Raoultella* species. JMM Case Rep. 2018;5. İnternet adresi: <http://.....> Erişim tarihi: .././20.. doi:.....

### B. Kitaplar

- **Kitap:** Appanna VD. Human Microbes - The Power Within Health, Healing and Beyond. Singapur: Springer Singapur; 2018.
- **e-kitap:** Appanna VD. Human Microbes - The Power Within Health, Healing and Beyond. Singapur: Springer

Singapur; 2018. İnternet adresi: <http://.....> Erişim tarihi: .././20..

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

### C. Sanal Ortam

- **Web sitesi:** World Health Organization. Global strategy for. Geneva: World Health Organization. 2001 [<http://www.who.international>]. (Erişim tarihi: .....).

### Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler Arap rakamları ile numaralandırılmalı ve yazı içinde geçtiği yerler belirtilmelidir.
- Tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne, sol kenardan başlanarak yazılmalı ve tablo sıra numarasından sonra nokta kullanılmalıdır. Örneğin; Tablo 1. *E. coli* izolatlarının MİK dağılımları, gibi.
- Tablolarda kullanılan kısaltmalar alt kısımda mutlaka açıklanmalıdır.
- Tablolarda metnin tekrarı olmamalıdır
- Şekil, fotoğraf, resim ve grafiklere ait açıklamalar ana metninle beraber en sona eklenerek yollanmalıdır.
- Şekillerde ölçü önemli ise üzerine cm veya mm'yi gösteren bir ölçek çizgisi konmalıdır.
- Fotoğraflar tanınmayı engelleyecek şekilde olmalı ve hastalardan yazılı onam alınmalıdır.
- İsim, baş harfler, hastane kayıt numarası gibi kimlik bilgileri yazılmamalıdır.

Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler gibi dökümanlar başka bir yayından alıntı ise yazılı baskı izni mutlaka gönderilmelidir.

