Cilt / *Volume* 50
Sayı / *Number* 1
Mart / *March* 2020

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✔ Geçmişten Günümüze Antibiyotik Duyarlılık Testi
- ✔ *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve Rifampisin Direncinin Saptanmasında Hızlı Moleküler Yöntemle Konvansiyonel Yöntemlerin Karşılaştırılması
- ✔ Yetişkinlerde Solunum Yolu Viral Etkenlerinin 2010-2018 Yılları Arasındaki Prevalansı ve Mevsimsel Dağılımı
- ✔ pADU34, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü
- ✔ Klinik Örneklerden İzole Edilen *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Antimikrobiyal Direnci Açısından İncelenmesi

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 50

Sayı / *Number* 1

Mart / *March* 2020

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 50 Sayı / *Number* 1 Mart / *March* 2020

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
Ebru Evren; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Bedia Dinç; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı
Ramazan Gümral; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Funda Doğruman-Al; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Özgür Kurt; Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Gürhan Çiftçioğlu; İstanbul Kültür Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Danışmanlar Kurulu / *Advisory Board*

Rıza Adaleti, İstanbul
Sinem Akçalı, Manisa
Elif Aktaş, İstanbul
İmre Altuğlu, İzmir
Şöhret Aydemir, İzmir
Asuman Birinci, Samsun
Gülendam Bozdayı, Ankara
Nural Cevahir, Ankara
Gülnaz Çulha, Hatay
Bora Doğan, Antalya
Gülfem Ece, İzmir
Mete Eyigör, Antalya
Dolunay Gülmez, İstanbul
Serdar Güngör, Uşak
Ufuk Hasdemir, İstanbul
Cüneyt Orhan Kara, Denizli
Didem Kart, Ankara
Esra Koçoğlu, İstanbul
Ahmet Koluman, Denizli
Gülay Korukluoğlu, Ankara
İpek Mumcuoğlu, Ankara
Tuncer Özekinci, İstanbul
Betil Özhak, Antalya
Dilara Öğünç, Antalya
Melda Özdamar, Kocaeli
Arzu Sayıner, İzmir
Şeref Tağı, Ankara
Mustafa Turan, İzmir
Serap Süzük Yıldız, Ankara
Fadile Yıldız Zeyrek, Urfa

Yayımlanan sayıya ait değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

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

Sahibi / *Owner*

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

Prof. Dr. 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: tmcdeditor@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

LOGOS TIP YAYINCILIĞI
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***

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 50 Sayı / *Number* 1 Mart / *March* 2020

İÇİNDEKİLER / *CONTENTS*

DERLEME / *REVIEW*

- **Geçmişten Günümüze Antibiyotik Duyarlılık Testleri**
  Antibiotic Susceptibility Tests from Past to Present
  Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU, Rıfat Vedat YILDIRIM, Gizem İNCE **1-9**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / *CLINICAL INVESTIGATIONS*

- ***Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve Rifampisin Direncinin Saptanmasında Hızlı Moleküler Yöntemle Konvansiyonel Yöntemlerin Karşılaştırılması**
  Comparison of a Rapid Molecular Method with Conventional Methods for Identification of Mycobacterium tuberculosis complex and Detection of Rifampicin Resistance
  Emre ÖZKARATAŞ, Müge Hacer ÖZKARATAŞ, Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK, Nuran ESEN **10-20**

- **Yetişkinlerde Solunum Yolu Viral Etkenlerinin 2010-2018 Yılları Arasındaki Prevalansı ve Mevsimsel Dağılımı**
  Prevalence and Seasonal Distribution of Respiratory Viruses in Adults Between 2010-2018
  Mert Ahmet KUŞKUCU, Bilgül METE, Fehmi TABAK, Kenan MİDİLLİ **21-26**

- **pADU94, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü**
  pADU94, a Cloning and Expression Vector with Chloramphenicol
  Hanife SALİH, Erman ORYAŞİN, Bülent BOZDOĞAN **27-34**

- **İÜ-C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda, 2013-2018 Yılları Arasında *Toxoplasma gondii, Rubella* ve Sitomegalovirus Seropozitifliği ile Avidite Test Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi**
  Retrospective Evaluation of Toxoplasma gondii, Rubella and Cytomegalovirus Seropositivity and Avidity Test Results in Patients Admitted to İU-C Cerrahpaşa Medical Faculty Hospital Between 2013-2018
  Esra DEMİR, Harika Öykü DİNÇ, Doğukan ÖZBEY, Seher AKKUŞ, Sevgi ERGİN, Bekir Sami KOCAZEYBEK **35-43**

- **Klinik Örneklerden İzole Edilen *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Antimikrobiyal Direnci Açısından İncelenmesi**
  Investigation of Antimicrobial Resistance of Stenotrophomonas maltophilia Strains Isolated from Clinical Specimens
  Melike Orkide TAŞÇILAR, Zafer HABİP, Tuncer ÖZEKİNCİ, Mücahide Esra KOÇOĞLU **44-48**

- **Türkiye'den Elde Edilen Kutanöz *Leishmaniasis* Etkeni İzolatların Sıvı Besiyerlerindeki Üremelerinin Karşılaştırılması**
  The Comparison of the Reproduction Rates of Leishmania Isolates in Liquid Culture Media which are Causative Agents of Cutaneous Leishmaniasis in Turkey
  Yalçın DEMİR, İbrahim ÇAVUŞ, Ahmet ÖZBİLGİN **49-55**

- ***Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. ve *Toxoplasma gondii*'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi ile Tanısı: Limit Saptama Pilot Çalışması**
  Identification of Leishmania spp., Plasmodium spp. and Toxoplasma gondii with Polymerase Chain Reaction: A Pilot Study for Limit Determination
  Tuba OYUR, Özgür KURT, İbrahim ÇAVUŞ, Ahmet ÖZBİLGİN **56-62**

YAZARLARA BİLGİ ..... **V-VI**

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):1-9
doi:10.5222/TMCD.2020.001

Derleme / *Review*

Geçmişten Günümüze Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiotic Susceptibility Tests from Past to Present

Ahmet Celal Başustaoğlu*, Rıfat Vedat Yıldırım, Gizem İnce***

*Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
**Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı, Ankara

ÖZ

Louis Pasteur (1822-1895), Robert Koch (1843-1910) ve özellikle Paul Ehrlich'in (1854-1915), antibiyozise ışık tutan yayınlanmış çalışmaları bakteriyolojinin ilk yıllarında, inhibe edici maddelerin organizmalar üzerindeki etkilerini gözlemlediklerini göstermektedir. Alexander Fleming'in (1881-1955) 1928'de penisilin ile ilgili yayınları tıp tarihinde bir dönüm noktasıdır. Daha fazla antimikrobiyal bileşik keşfedildikçe, bu antimikrobiyallerin kullanımı yoluyla bulaşıcı hastalıkların ortadan kaldırılacağı tahmin edilmiştir. Antimikrobiyal bileşikler keşfedildikçe, bu antimikrobiyallerin kullanımı ile bulaşıcı hastalıkların yok edileceği düşünülmüştür. Maalesef, bu antimikrobiyallere karşı gelişen bakteriyel direnç bu iyimserliği hızla azalttı ve mikrobiyoloji laboratuvarının bu ajanlara duyarlılığı belirlemek için test yöntemleri geliştirmesine yol açtı. İlk araştırmacılar tarafından, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin sonuçlarını etkileyen birçok değişken olduğu hızla anlaşılmış ve değişkenlerin standardize edilebilmesi için onlarca yöntem geliştirilmiş ve bu yönde çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak, bu standardizasyon ihtiyacı, standart antibiyotik duyarlılık test metodolojileri geliştiren birçok organizasyonun oluşturulmasını sağlamış ve günümüzde de bu standartlar kullanılır olmuştur. Bu derlemede, meslektaşlarımıza ışık tutması amacıyla bu yöntemlerin tarihçesi ve gelişimi anlatılmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Antibiyotik duyarlılık testleri, antibiyotik direnci, tarihçe*

ABSTRACT

The published studies of Louis Pasteur (1822-1895), Robert Koch (1843-1910), and especially Paul Ehrlich (1854-1915) referring to antibiosis, shows that in the early years of bacteriology they observed the effects of inhibiting agents on organisms. Alexander Fleming's (1881-1955) publications on penicillin in 1928 was a milestone for medical history. As the antimicrobial compounds are discovered, it is thought that infectious diseases will be eliminated with the use of these antimicrobials. Unluckily, bacterial resistance to these antimicrobials quickly reduced this optimism and led the microbiology lab to develop test methods to determine sensitivity to these agents. Early researchers quickly understood that there were many variables affecting the results of antimicrobial susceptibility tests, and dozens of methods were developed and evaluated to standardize these variables. As a result, the need for standardization has directed many organizations to the production of standard antibiotic susceptibility tests methodologies, which are used today. In this review, the history and development of these methods are summarized to guide our colleagues.

Keywords: *Antibiotic susceptibility tests, antibiotic resistance, history*

Alındığı tarih / Received:
23.07.2019 / 23.July.2019
Kabul tarihi / Accepted:
01.10.2019 / 01.October.2019
Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

A. Başustaoğlu 0000-0002-2571-0637
R. V. Yıldırım 0000-0001-8982-7239
G. İnce 0000-0002-9012-620X

✉ rvyildirim77@gmail.com

Atıf: Başustaoğlu AC, Yıldırım RV, İnce G. Geçmişten günümüze antibiyotik duyarlılık testleri. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):1-9.

GİRİŞ

Pasteur, Koch ve özellikle Paul Ehrlich'in, antibiyozise ışık tutan yayınlanmış çalışmaları, bakteriyolojinin ilk yıllarında araştırmacıların, inhibe edici maddelerin organizmalar üzerindeki etkilerini gözlemlediklerini göstermektedir. Özellikle Paul Ehrlich'in Konigliches Enstitüsü müdürü olarak enfeksiyon hastalıklarını tedavi etmek için yeni kimyasal ajanlar geliştirmeye odaklanan çalışmalarını vurgulamak gerekir [1,2].

İlk kemoterapötik olarak etkili antibiyotik, 1929'da uzun süredir yara enfeksiyonlarının tedavisi ile ilgilenen İngiliz bir bakteriyolog olan Alexander Fleming (1881-1955) tarafından keşfedildi. Kırsal kesimdeki bir tatilden dönerken laboratuvarında tek bir küf

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

kolonisi tarafından kontamine olmuş bir *Staphylococcus aureus* kültürünü bir yığın petri kabının arasından fark etti. Fleming plağı gözlemlerken, küfü saran kolonilerin saydam olduğunu ve parçalanmaya maruz kaldığını ve küfün, ortamdaki kolonilerin parçalanmasına neden olan bir kimyasal maddeyi ortama salgıladığını düşündü. Gözleminin olası kemoterapötik önemini algılayan Fleming, *Penicillium* spp. olarak tanımlanan küfü izole etti ve kültür süzüntülerinin penisilin adı verilen bir antibakteriyel madde içerdiğini tespit etti. İlk kez üreme inhibisyon alanını gözlemleyerek daha sonra penisilin olarak adlandırılacak maddenin inhibe edici etkisine ilişkin ilk gözlemini yaptı. Bu olay çağdaş duyarlılık testi metodolojilerinin evrimi için başlangıç noktasıdır[1,2].

Fleming tüm uğraşlarına rağmen, penisilini saflaştıramadı, ancak bu hâliyle birçok gram pozitif bakterinin üremesini önlemedeki dikkate değer etkinliğini gösterdi ve hatta insanlarda göz enfeksiyonlarının lokal tedavisi için başarı ile kullandı. Bu arada, sülfonamidler gibi diğer antibiyotik olmayan bileşiklerin kemoterapötik etkinliği keşfedilmişti ve penisilinin saflaştırılmasındaki zorluklarla cesareti kırılan Fleming, bunun üzerinde daha fazla çalışmayı bıraktı[1,2].

On yıl sonra, H.W. Florey (1898-1968) ve E. Chain (1906-1979) penisilin çalışmasına devam etti. Kısmen saflaştırılmış malzemeyle yapılan klinik çalışmalar çarpıcı bir şekilde başarılı oldu. Ancak bu zamana kadar, İngiltere savaştaydı; penisilinin endüstriyel gelişimi, birçok laboratuvarda yoğun bir araştırma ve geliştirme programının başlatıldığı Amerika Birleşik Devletleri'nde yapıldı. Üç yıl içinde, penisilin endüstriyel ölçekte üretiliyordu[1,2].

Öncelikle gram pozitif bakterilerin neden olduğu bazı bakteriyel enfeksiyonlar üzerine penisilinin belirgin kemoterapötik etkinliği, yeni antibiyotikler üzerinde yoğun araştırmalara neden olmuştur. Yeni antibiyotikler keşfedildikçe, enfeksiyonlara karşı mücadelenin sonuna gelindiği düşünülüyordu. Ne yazık ki ortaya çıkan direnç ile bu iyimserlik hayal kırıklığına dönüştü. Tedavide başarısızlıkların ortaya çıkması, direncin belirlenmesi için yöntemler geliştirilmesine yol açtı. Öncelikle penisilin üzerine yapılan çalışmalar ile günümüzdeki in-vitro test kavramı gündeme geldi ve modern antimikrobiyal duyarlılık test metodolojisinin temelini oluşturdu. Daha sonraki yıllarda antimikrobiyal duyarlılık testinin gelişimi üzerine birçok yazar tarafından çok çeşitli çalışmalar yayınlandı[1,3].

Bu makalemizde, rutinde uyguladığımız antibiyotik duyarlılık testlerinde hâlen sıklıkla kullandığımız bazı yöntemlerin tarihini ve gelişimini, ulaşabildiğimiz makalelerden yola çıkarak derlemeyi amaçladık. Ayrıca bu konuda ülkemizde yapılmış çalışmalardan bazıları örnek olarak sunulmuştur. Bu tarihsel veriler ile elde edilen deneyimlerin ileride yapılacak birçok araştırmaya ışık tutacağını düşünüyoruz.

Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Tarihsel Gelişimi

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının sorumlulukları arasında, enfeksiyon hastalıklarında etken bakterinin izole edilmesi, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) uygulayarak tedavide klinisyene yol gösterici olmak yer almaktadır. Bir septik hastanın yaşamı tehdit eden durumu ve hastanelerde antibiyotiğe dirençli bakterilerin artan prevalansı göz önüne alındığında, doğru, güvenilir ve hızlı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Hâlen günümüzde yaygın olarak kullanılan disk difüzyon, agar dilüsyon, gradyent şerit test, sıvı dilüsyon ve otomatize test sistemleri hakkında yapılmış bazı çalışmalardan örnekler aşağıda tarihsel gelişim sırasıyla yer almaktadır. Gelişmekte olan "Multiplexed automated digital microscopy", "Single-cell morphological analysis", "Celloscope", "BacterioScan FLLS", "Life Scale Microchannel Resonator", "Genefluidics", "AFM Cantilever", "Flow Cytometry" gibi yeni geliştirilen veya geliştirilmekte olan ve rutin kullanıma henüz girmemiş olan tekniklerden burada sözedilmeyecektir[4].

- 1874; William Roberts (1830-1899), "Studies on biogenesis" isimli makalesinde Penicillium glaucum küfünün içinde büyüdüğü sıvı besiyerinin bakteri ile kolayca kontamine olmadığını gözlem-

ledi (Philosophical Transactions of the Royal Society of London). Lechevalier ve Solotorobsky'nin "Three Centuries of Microbiology, 1965" isimli kitaplarında mikrobiyolojinin ilk yıllarında araştırmacıların bazı maddelerin bakteriler üzerine inhibe edici etkileri ve organizmalar arasındaki inhibe edici etkileşim üzerine çalıştıklarını belirtilmektedir[1,2,5].

- 1889, Beijerinck (1851-1931) tarafından farklı toksinlerin bakteriyel gelişim üzerindeki etkisini incelemek için agar difüzyon tekniği kullanıldı[1,2].
- 1924, Fleming bir test çözeltisinin antimikrobik niteliklerini değerlendirmek için "ditch plate" tekniğini geliştirdi. Agar yüzeyine test edilecek organizmayı ekip, agar üzerine açtığı kanal içine test edeceği solüsyonu koyup inkübasyondan sonra hendek etrafındaki inhibisyon alanını gözlemledi[1,2,6].
- 1929, Reddish, agara hazneler açıp bu hazneleri antiseptik çözeltilerle doldurarak Fleming'in 1924'te uyguladığı tekniği değiştirdi. Bu tekniğin prensibi, "Oxford cup", "fish spine" veya "Heatley cup" ile eş anlamlı disk plakaları ile daha da geliştirilmiştir[1,2,6,9]. Bu teknik, çağdaş minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) metodolojisinin öncüsü olarak tanımlanmıştır. Fleming 1942 yılında, bulanıklık yerine pH'ı indikatör olarak kullanarak sıvı dilüsyon tekniğini geliştirdi[2,7,8].
- 1940, Heatley (1911-2004) duyarlılığı değerlendirmek için test edilecek antibakteriyel madde emdirilmiş emici kâğıtları kullandı. Penisilin içeren filtre kâğıdı diskleri ilk kez Vincent ve Whitgrove Vincent tarafından kullanılmıştır[1,2,10]. Bu yöntemin iş yükünü ve zamanı azaltacağını ve daha verimli sonuçlar alınacağını savunmuşlardır. Aynı yayında Hobby (1910-1993) ve ark.'nın 1942 yılında plak yönteminde besiyeri derinliğinin, kuruluğunun ve bakterilerin lag fazında olmalarının dezavantaj yarattığı yorumları yer almaktadır[1,2,9].
- 1940, Schmith ve Reymann, ilk kez agar dilüsyon yöntemini sulfapiridin etkinliğini gonokoklar üzerinde test ederek uyguladılar[1,2].
- 1940, Gardner, bulanıklık yerine organizmadaki morfolojik değişimleri son nokta olarak kullandığı bir sıvı dilüsyon tekniği kullandı. Bu yöntem, antibiyotik sonrası etkiyi değerlendirmek için kullanılan günümüz yöntemlerinin öncüsü sayılabilir[2].
- 1941, Abraham ve ark.[2], agara yerleştirilen bir silindirin içine antimikrobiyal maddeleri koydu ve buradan agara yayılmasını sağladı. ABD'de bu silindirler penisilin silindirleri olarak tanımlanmıştı ve çeşitli antimikrobiyal maddeleri değerlendirmek için popüler bir test yöntemi hâline geldi.
- 1942, Fleming yukarıda belirtildiği gibi bulanıklık yerine pH'ı indikatör olarak kullanarak sıvı dilüsyon tekniğini geliştirdi[2,8]. Birçok araştırmacı bu yöntemi çeşitli şekillerde kullandılar. Genel olarak bu uygulama başarılı olamadı ancak ileride geliştirilen Alamar sistemine ışık tuttu.
- 1942, Rammelkamp ve Maxon, Schmidt ve Sesler gibi araştırmacılar sıvı dilüsyon tekniği üzerine çalışmalarını yayınladılar[1,2].
- 1945, Mohs, 15 mm çapında diskleri olan bir "radyal ekim disk yöntemi" tanıttı. Bu, bir test organizmasının aynı plak üzerinde hassas bir kontrol ile karşılaştırılmasının ilk uygulanmasıydı. Bu yöntem, yakın zamana kadar İngiltere'de birçok laboratuvarda hâlâ kullanılan Stokes tekniğinin öncüsü olarak tanımlanmıştır[1,2,11].
- 1945,Copeland, Morley gibi diğer araştırmacılar da aynı yıl disk yönteminde teknik değişiklikler yaptılar[2].
- 1945; Frisk, *Streptococcus pneumoniae*'nın duyarlılığını test ederken penisilinin agar içerisine katılmasını tanımladı. Daha sonra Frank ve çalışma arkadaşları çok sayıda antibiyotik-organizma kombinasyonunun incelenmesi için agar dilüsyonunu kullandılar. Bu dönemde yapılan çalışmalar ile agar difüzyon ve agar dilüsyon teknikleri uygun şekilde uygulandığında benzer sonuçlar elde edildiği ancak agar dilüsyonun zahmetli ve zaman alıcı olduğu görüldü[1,2,12]. Yöntem, seri dilüsyonların organizmaları dirençli ve duyarlı kategorilere ayıran bir veya daha fazla kritik konsantrasyon ile değiştirilmesiyle basitleştirildi. Bu yöntem ilk kez Ericsson ve Sherris tarafından kullanılan ve günümüzde yaygınlaşan bir terim olan sınır değer "break point" tekniği olarak anılır.

İkinci Dünya Savaşı'nın sonunda, penisilinin birçok bulaşıcı hastalığın tedavisi için yaygın kullanımı nedeniyle tüp dilüsyon, disk difüzyon yöntemleri ve agar dilüsyon yöntemlerinin hepsi, penisilin duyarlılığının kesin olarak tahmin edilmesi için geçerli yöntem olarak kabul edildi. Bu dönemde, hem Gram pozitif hem de Gam negatif enfeksiyonları tedavi etmek için tasarlanmış yeni antimikrobiyal ajanların kullanımı başlamış ve ilaçların sayısı arttıkça, duyarlılığı tahmin etme ve belirli bir enfeksiyonu tedavi etmek için en uygun ajanları seçme gereksinim artmış bu da pratik metodoloji kullanarak duyarlılığı veya direnci ortaya koymak için yenilikçi yaklaşımları beraberinde getirmiştir[1,2].

- 1946, Garrett, agar dilüsyon testini gerçekleştirmek için çok sayıda replikasyon cihazı geliştirdi ve duyarlılığı değerlendirmek için çok sayıda seri dilüsyon kullanımı yerine kritik dilüsyonlar konseptini ortaya koydu[2].
- 1947, Hoyt ve Levine, emdirilmiş filtre kağıdı yerine penisilin içeren tabletleri kullanan bir teknik geliştirdiler ve bu metodla penisilin ve streptomisin duyarlılıklarını çalıştılar[6,13].
- 1947, Bugün hâlâ yaygın olarak kullanılan çeyrek inçlik (6-6.5 mm) filtre kağıdı diskleri ilk olarak 1947'de Bondi ve ark. tarafından tanımlandı[2,14].
- 1950, Frank, Wilcox ve Finland birçok antibiyotik-organizma kombinasyonu için agar dilüsyon yöntemini denediler[2,15].
- 1952, Gould ve Bowie disk difüzyon tekniği ile çeşitli konsantrasyonlardaki diskleri kontrol organizmaları ile karşılaştırdılar[1,2].
- 1952, Szybalski ve ark., agar dilüsyon yöntemleri üzerine çeşitli çalışmalar yaptılar[1,2].
- 1954, Jackson ve ark., antibiyotik duyarlılığını belirlemek için indikatör olarak hemoglobin kullanımını geliştirdiler[1,2,16].
- 1955, Stokes bilinen izolatlar ile klinik izolatları diskler ile plak üzerinde karşılaştırdığı ve kendi ismini taşıyan yöntemi sundu. Bu yöntem tüm Avrupa'da yaygın olarak kullanılmıştır[1,2].
- 1959, Steers, Foltz ve Graves, diğer birkaç uygulama ile agar dilüsyon yöntemini basitleştiren ve hâlâ kullanılan bir replikasyon cihazını geliştirdiler[2].
- 1959, Bauer, Roberts ve Kirby tek disk, çoklu disk ve plak dilüsyon tekniklerini yayınladılar. Bu yöntemleri, daha sonra Kirby Bauer duyarlılık testi yöntemi olarak bilindi[2,17].
- 1959, Ericsson ve ark., duyarlılık testleri ve klinik yorumlanması üzerine çalışmalar yayınladılar[1,18].
- 1960, Steers ve ark.[2], agar difüzyon ve dilüsyon tekniklerini karşılaştıran çalışmalar yaptı. Neredeyse eşzamanlı olarak, Anderson ve Troyanosky düşük etkili diskler kullanan başka bir standart disk tekniği tanıttı.
- 1963, Tolhurst, Buckle ve Williams, zahmetli dilüsyon aralığını kullanmak yerine birçok ilacın belirli bir klinik izolatta test edilmesini sağlamak için, kritik sınır değerleri çevreleyen dilüsyonlara odaklanarak, tüp dilüsyon tekniğini değiştirmede önemli ilerleme kaydetmiştir[2].

Bu dönemde rutin bakteri izolatları için agar dilüsyon ile MİK tahminlerinin yapılmasının çok zaman alıcı ve zahmetli olduğu kabul edilmiş, ancak çoklu replikasyon cihazları ile yapılan seri dilüsyonlar, organizmaları dirençli ve duyarlı kategorilere ayıran bir veya daha fazla kritik konsantrasyon ile değerlendirerek basitleştirilmişti. Bu yöntem ilk olarak Ericsson ve Sherris tarafından kullanılan bir terim olan "sınır değer" "breakpoint" tekniği olarak adlandırılmaktadır. Kırılma noktası tekniğinin yaygın kullanımı, bilinen miktarlarda, önce filtre kağıdı petlerinde ve daha sonra filtre kağıdı şeritlerinde mevcut olan antimikrobiyal madde ile kolaylaştırılmıştır.

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, bakterilerin antimikrobiyallere duyarlılığını belirlemek için farklı besiyerleri, inokülum konsantrasyonları, inkübasyon süreleri, inkübasyon sıcaklıkları ve farklı antimikrobiyal konsantrasyonlar kullanarak farklı yöntemler uyguladılar[1-3]. Bu konuda birçok araştırmacı, yöntemde çeşitli karışıklıklara neden olan birçok farklı protokoller yayınladı ve bu testlerin sonuçlarını etkileyen birçok değişken olduğu hızla anlaşıldı. Sonuç

olarak, bu tekniklerin standardizasyonuna gereksinim duyulduğuna dair (1950'lerin sonlarından itibaren) bir tartışma başladı. Bu gereksinim, birçok kuruluşun standartlaştırılmış ADT metodolojileri geliştirmelerine yol açmıştır. 1959'dan başlayarak, duyarlılık testini standartlaştırma gereksinimi belirgin hâle geldi ve bazı kuruluşlar ve araştırmacılar bu kritik konuyu ele almaya başladı[1-3]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), antimikrobiyal duyarlılık testi metodolojisinin standardizasyonu konusunu ele aldı ve bir rapor yayınladı[18].

- 1966, Bauer, Kirby ve ark., bu konudaki yayınları kapsamlı olarak gözden geçirip, birleştirip güncellediler ve disk difüzyon tekniğini pratik bir yöntem olarak kurma girişimlerini yayınladıkları zaman, disk difüzyon metodunun standartlaştırılmasında önemli ilerleme kaydedildi[1,2,20].
- 1971, Ericsson ve Sherris, duyarlılık testi yöntemlerini değerlendirmek için DSÖ'nün sponsor olduğu, ADT'nin 10 yıllık Uluslararası İşbirliği Çalışması sonuçlarını yayınlandılar[21]. Bu çalışma, büyük ölçüde Ericsson ve meslektaşları tarafından tanımlanan disk difüzyon yöntemine dayanıyordu. Diğer birçok araştırma ADT metodolojisini standart hâle getirmek için bu ilk girişimleri takip etti. Bu dönemde Avrupa'da, ADT için en az altı farklı sistem kullanılmaktaydı. 1972 yılında Stokes ve Waterworth'ün çalışmaları, duyarlılık testini standartlaştırma girişimlerine büyük katkı sağlarken 1973 yılında Haltalin, Markley ve Woodman, agar dilüsyonda kritik sınır değerler üzerine çalışmalar yaptılar[2].
- 1975, Bauer ve Kirby'nin yayını[20], tek bir antimikrobiyal diski ile duyarlılık testi için standart bir prosedür geliştirilmesine zemin hazırladı ve 1974 yılında, Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi ("National Committee for Clinical Laboratory Standards", NCCLS) tarafından geçici standardın yayınlanmasına zemin oluşturdu[22]. Daha sonra, 1975 yılında, aynı kuruluş tarafından onaylanmış standart yayınlandı[23]. Sonuçta, disk difüzyon duyarlılık testi için standart bir prosedür elde edildi ve bundan sonra Kirby-Bauer disk difüzyon testi olarak adlandırıldı. Kirby-Bauer disk difüzyon duyarlılık testinin amacı, klinisyene tedavi seçeneklerini seçmesine yardımcı olmak için patojenik aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin çeşitli antimikrobiyal bileşiklere duyarlılığını veya direncini belirlemekti[1-3].
- 1975 sonrası her ne kadar bazı yazarlar, disk difüzyon teknikleri kullanılarak elde edilen sonuçları hızlandıran metotları tanımlamış olsalar da, kullanılan yöntemler esas olarak 18 ila 24 saat inkübasyona dayanmaktaydı. Ayrıca, düşük emek girdisine sahip hızlı yöntemler için klinik ve ekonomik baskılar, alternatif ADT yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu dönemde klinik mikrobiyoloji ve klinik biyokimya gibi dallardaki diğer uygulamalarda olduğu gibi antibiyotik duyarlılık testlerinde de gittikçe artan şekilde hata payını, maliyeti, süreyi ve özellikle iş yükünü azaltan otomasyon uygulamaları gündeme geldi[1-3].

Bactec (Becton Dickinson, ABD) sisteminin kan kültürü otomasyonundaki başarısı, otomasyonun klinik mikrobiyolojideki geçerliliğini arttırdı. Bu dönemde, bilgisayarların birçok laboratuvarda veri işlemedeki başarısı klinik mikrobiyolojinin bu gerekli modernleşmeye uyum sağlaması gerektiği algısını yaratmada önemli bir faktördü. Ne yazık ki disk difüzyon yöntemi, otomasyona olanak vermediği için dilüsyona dayalı otomatize antimikrobiyal test sistemleri, algılanan çoğu sorunun çözümü gibi görünüyordu[1-3].

İlk otomatik ADT yöntemlerinden biri, Pfizer Diagnostics (Almanya) tarafından pazarlanan ve tanıtılan "Autobac disc elution" sistemi idi. Bu sistem, bazı sonuçların 4-6 saatte rapor edilmesini sağladı. Antimikrobiyal duyarlılık testi alanında devrim yapma potansiyeline sahipti, ancak temel dezavantajlarından biri, bir organizma tanımlama sistemine sahip olmaması idi. 1975'e kadar, bu yeni hızlı otomatize sisteme olan ilgi, bu yeni aracın klinikte ne gibi bir rol oynayacağına odaklandı[1-3]. Yukarıda da belirtildiği gibi aynı yıl (NCCLS), onaylanmış Antimikrobiyal Duyarlılık Test Standartlarını yayınladı[23]. Bu, duyarlılık testi metodolojisini standartlaştırmaya yönelik

daha önceki girişimlerin çoğunu ortak noktada birleştirdi ve ilk kez klinik laboratuvarlar tarafından benimsendi.

- 1977, ikinci otomatik sistem, 1977'de tanıtılan Abbott MS-2 (ABD) Sistemi idi. Bu sistem dört saatte sonuç veren bir sistemdi, bir organizma tanımlama bölümü içeriyor ve MİK değerlerini hesaplıyordu. Bunu kısa bir süre sonra, 1977'de McDonnell Douglas Corporation (ABD) tarafından sunulan AMS Sistemi takip etti ve bu sistem, bugün Vitek (BioMérieux, Fransa) Sistemi olarak bilinen sistemin öncüsü oldu. Bu sistem kapalı plastik kartlarda kurutulmuş reaktifler kullanmakta ve duyarlılık testi ve organizma tanımlaması için ayrı kartlar içermekteydi. Bu üç sistem sonraki yirmi yılda hâkim olacak olan otomatize sistemlerin öncüsü oldular. Gelecekte otomatik duyarlılık testi metodolojisinin öncü rol oynayabilecek teknolojik bir yenilik olması nedeniyle, 1977 yılı duyarlılık testi alanında da önemli bir yıldır. Daha sonra 1981 yılında İsveç Standardizasyon Grubu, 1984 yılında da Alman Standardizasyon Grubu ve daha sonra Fransa Mikrobiyoloji Derneği ilk kez standartlarını yayınladı[1-3].
- 1977, Thornsberry ve ark.[2], duyarlılık testini gerçekleştirmek için standartlaştırılmış mikrotitre plaklarının piyasaya sürülmesine öncülük yaptı.
- 1978, Phillips ve ark.[2], bu uygulamayı temel alarak ilk önce dondurulmuş paneller, daha sonra liyofilize panelleri geliştirdi. Bu paneller, aynı inokülumdan organizma tanımlayabiliyor ve MİK değerlerini saptayabiliyordu. Ticari olarak üretilen bu panellerin otomatik değerlendirilmesi bir sonraki mantıklı adımdı ve tüm diğer teknolojik gelişmeler gibi, bu yeni teknoloji de hızla gelişti. Bu teknolojinin uygulanması, Micro-Media Systems (ABD), Sensititre (Trek Diagnostics, İngiltere), BBL Sceptor (Becton Dickinson, ABD), TouchScan (Dade Behring, ABD), AutoScan (Dade Behring, ABD) ve mevcut MicroScan WalkAway (Bekman Coulter, ABD), VITEK (BioMérieux, Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, ABD) gibi yarı otomatize/otomatize sistemlerin geliştirilmesine yol açtı. Teknolojideki bu gelişmelere rağmen, disk difüzyon metodolojisi, ekonomik olması, kolay uygulanması gibi özellikleri ile kullanılırlığını sürdürmüştür.
- 1986, Krogstad ve Moellering 1953 yılında Elion ve ark.'nın anti kanser ilaçlarda kullandıkları dama tahtası ("checkerboard") yönteminin bakterilere uyarlanması üzerine çalıştılar. Seyreltme testi, performans, standardizasyon ve yorumlamada sorunlar olmasına rağmen, birçok ilaç için in-vitro sinerjinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanıldı[2,24]. Sonuçlar, kombinasyonların sinerjik, additif veya antagonistik olarak sınıflandırılmasını sağlamaktadır.
- 1987, iki katlı dilüsyon şeması üzerine Horrevorts ve ark.[25] tarafından alternatif bir yöntem önerildi. *S. aureus*'a karşı rifampin ve minosiklin kullanılarak bir dizi çalışma yaptılar.
- 1988, Stabilize ve kurutulmuş ilacın sürekli konsantrasyon gradyanını taşıyan ince bir reaktif şeridinden uygulanan gradyent şerit testi, agar ortamı üzerindeki antimikrobiyal ajanların minimum inhibitör konsantrasyonunu belirlemek için geliştirilen yeni bir in-vitro yöntem olarak ilk kez 1988'de Los Angeles'taki "Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)" Kongresinde sunuldu[26]. Eylül 1991'de gradyent şerit test, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayını aldıktan sonra dünya çapında bir MİK testi olarak kullanıma girdi[3]. 1950'lerde AB BIODISK'in (İsveç) bilimsel kurucusu Hans Ericsson (Karolinska Enstitüsü), disk difüzyon yöntemini standart hâle getirmek, yinelenebilirliğini ve güvenilirliğini geliştirmek için bir dizi çalışma yaptı. Disk difüzyon test sonuçlarından gelen inhibisyon zon çaplarını, referans agar seyreltme yöntemine dayanan MİK değerleriyle karşılaştırdı. Zon çapları ve MİK değerleri arasındaki korelasyon, regresyon analizi kullanılarak değerlendirdi.
- 1998, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) tarafından standardize edilen tüm duyarlılık teknikleri, izole

edilmiş bakterileri fenotipik olarak test etmeye dayanmaktadır. Her ne kadar bu fenotipik duyarlılık test teknikleri nispeten basit olsa da bakteriyel izolasyon gerektirirler ve bu nedenle duyarlılık testi sonucu örnek alındıktan yaklaşık iki gün sonra elde edilebilir. Bergeron ve Ouellette 1998 yılında, duyarlılık profili elde etmek için genellikle birden fazla yöntemin yapılması gerektiği gerçeği gibi, duyarlılık testine fenotipik yaklaşımın diğer eksikliklerine dikkat çekti ve direnç testinin genotipik yaklaşım ile doğrulanması gerektiğini vurguladı[1,27]. Direnç testinin hızını ve güvenilirliğini arttırmak için, genotipik bir yaklaşımın kullanımı savunuldu ve bakteriyel direnç genlerinin belirlenmesi için çok sayıda DNA bazlı analiz geliştirildi. Bu yaklaşım gerçek bir devrim olarak tanımlanmış olmasına rağmen, direnç mekanizmalarının ve ilgili genlerin iyi bir şekilde anlaşılmasını gerektirmektedir. Birçok araştırmacı bu yöntem için kısıtlamaları da vurgulamaktadır, çünkü bir direnç geninin varlığı her zaman dirençli bakterilerin göstergesi olmayabilir ve bunun tersine, bir antibiyotiğe direnç kodlayan bir gen belirlenmezse, bakterilerin o belirli maddeye duyarlı olduğu anlamına gelmeyebilir[2,3].

Yeni bir binyıla girerken, rutin tanısal klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmakta olan çoğu ADT metodolojisi, ilk olarak yirminci 20. başında açıklanan tekniklere dayanacaktır. Bu yöntemlerin sınırlamaları anlaşılırsa ve prosedürler standartlaştırılırsa, üretilen sonuçlar duyarlılığa, uygun maliyetli bir şekilde güvenilir bir rehber sunacaktır. Yeni, genotipik direnç test yöntemlerinin rutin kullanım için pratik olması ve rutin testler için değerlendirilmeden önce rekabetçi bir şekilde fiyatlandırılması gerekir. Ayrıca, karışık bir popülasyondaki farklı patojenler veya klinik önemi olmayan organizmalar hakkında rapor vermekten kaçınmak için direnç geni taşıyan organizmanın tanımlanması gerekir. Bu sayede, onlardan yarar görmeyecek hastalarda antibiyotiklerin kullanılmasını engelleyerek bakteriyel direnç riskini azaltabilirler.

Halen, Amerika Birleşik Devletleri'nde CLSI, Avrupa'da EUCAST, Kirby ve Bauer'ın orijinal prosedürünün küresel bir uzlaşma süreci boyunca güncellenmesinde ve değiştirilmesinde öncülük yapmaktadırlar.

Ülkemizdeki Durum

Ne yazık ki yukarıda bahsettiğimiz dönemdeki teknolojik gelişmelere destek olan bir çalışma ülkemizde yapılmamış, çalışmalar yalnızca duyarlılık testlerinin uygulanması ile sınırlı kalmıştır. Kocagöz ve ark.[28] tarafından geliştirilen ve 4-6 saatte sonuç alınabilen "Quicolor Yöntemi" (Salubris, Türkiye) bu konuda ülkemizde geliştirilen tek yöntem olmuştur. Bu yöntemin Amerikan Patent Dairesi'nden 6.265.182 B1 sayı ve 24 Temmuz 2001 tarih ile patenti alınmıştır[28].

Ülkemizde yapılan ilk duyarlılık çalışmalarına örnekler [Milli Kütüphane (MK)] aşağıda sunulmuştur:

1. Zeki Tolgay (1946). Yeni antibiyotik ve antibakteriyel maddeler hakkında. Türk Veteriner Hekimleri Derneği Dergisi. 16(10) 84/89. MK Yer No 1960 SA 105
2. Nureddin Onur (1949); Streptomycine'e karşı tali mukavemet ve tüberküloz kliniği. İstanbul, 1949 (Kader Matbaası) Milli Kütüphane Yer No 1949 AD 1880
3. Gören Sadık (1949). Bakteriyostatik ve antibiyotik ilaçların karşısında serum ve aşıların durumu. Türk Hij. ve Tec. Biol. Dergisi. 9(1)1949. Milli Kütüphane Yer No 1974 SA 165
4. Çintan Mefkure (1952). Streptomycin rezistansı. İst. Ün. Tıp Fak. Mec. 15(3) 1001/1010, 1952. Milli Kütüphane Yer No 1952 AD 1742
5. Razi Maner, (1953) Koch basilinin streptomycin'e karşı mukavemetinin tetkikinde yeni bir usul / Kader Basımevi, 1953. Milli Kütüphane Yer No. 1953 AD 1884
6. Özdem Anğ, Kurtuluş Töreci (1961) 214 bakteri suşunun spiramycin'e hassasiyetlerinin denenmesi/(İstanbul: İsmail Akgün Matbaası) 849-855. Milli Kütüphane Yer No 1961 AD 3561
7. Enver Tali Çetin, Özdem Anğ, Edip Önöz, Kurtuluş Töreci (1960) 1958-1959 senelerinde izole ettiği-

miz 405 bakteri suşunun sulfamidlere hassasiyetlerinin denenmesi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 23(3).1960.
8. Enver Tali Çetin ve ark. (1960) 1958 ve 1959 senelerinde izole ettiğimiz 405 bakteri suşunun antibiyotiklere ve furadantin'e hassasiyetlerinin denenmesi. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 23(1-2) 1.1960, 143 - 169. Milli Kütüphane Yer No: 1956 SA 254
9. Özdem Anğ; (1962) Mukavim Neisseria gonorrhoeae suşlarının izole edildiği üretritlerin artışı. 10. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Serbest tebliğ, 1962.
10. Enver Tali Çetin; (1962) Antibiyotiklere mukavim bakterilerde hastane enfeksiyonlarının çoğalmasının önemi, Yeni Tıp Alemi Dergisi, 11;105, 1962
11. Necmettin Alkış (1962) Muhtelif bakterilerin antibiyotiklere hassasiyetleri ve bu hususta kullanılan testlerin mukayesesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 22(2-3) 1.1962, 144-156. Milli Kütüphane Yer No: 1974 SA 165
12. Razi Maner, (1963) Antibiyotik Test Hakkında Bazı Mütalaalar. Hastane 6(8) 8.1952, 328-332. Milli Kütüphane Yer No. 1963 SA 75
13. Enver Tali Çetin, (1963) Bakterilerin antibiyotiklere mukavemeti Yeni Tıp Alemi Dergisi, 133; 7, 53-68, 1963 Milli Kütüphane Yer No: 1963 AD 4313
14. Hakkı Bilgehan, (1964) Drog Rezistans, Antibiyogram ve Klinik Değerlendirilmesi. Ege Tıp Cemiyeti Mecmuası 2(1) 6.1964, 34-41. Milli Kütüphane Yer No. 610
15. Enver Tali Çetin, Özdem Anğ, Kurtuluş Töreci, Önder Ağbaba (1967) 1964-1965 yıllarında izole ettiğimiz 1521 bakteri suşunun antibiyotiklere hassasiyeti. Tıp Fakültesi Mecmuası, 29; 4, 588-602 1967. Milli Kütüphane Yer No. 1967 AD 5055
16. Enver Tali Çetin, Özdem Anğ, Kurtuluş Töreci (1970) 1968-1969 Yıllarında İzole Ettiğimiz 1333 bakteri suşunun antibiyotiklere hassasiyeti. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 33(4) 1.1970, 615 - 628. MK Yer No. 1956 SA 254

Antibiyotikler, bulundukları günden bu yana insanların elini enfeksiyonlara karşı önemli ölçüde güçlendirmiştir. Patojenler de her yeni çıkan antibiyotiğe karşı direnç mekanizmaları geliştirerek kendilerini savunmuşlardır. Ne yazık ki bugüne kadar bulunan tüm antibiyotiklere karşı farklı bakterilerde de olsa bir direnç gözlenmiştir. Bu konunun mikrobiyoloji dünyasının en çok araştırma yayınlanan konusu olduğunu ve bundan dolayı, bu tarihsel veriler ile elde edilen deneyimlerin ileride yapılacak birçok araştırmaya ışık tutacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Wheat PF, Spencer RC. The evolution of in-vitro antimicrobial susceptibility techniques. J Antimicrob Chemother. 1988;22(5):579-82. https://doi.org/10.1093/jac/22.5.579
2. Poupard JA, Rittenhouse SF, Walsh LR. The evolution of antimicrobial susceptibility testing methods. Adv Exp Med Biol. 1994;349:3-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9206-5_2
3. Isenberg HD. Antimicrobial susceptibility testing: A critical evaluation. J Antimicrob Chemother. 1988;22(Suppl A): 73-86. https://doi.org/10.1093/jac/22.supplement_a.73
4. Syal K, Mo M, Yu H, et al. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. Theranostics. 2017;7(7):1795-805. https://doi.org/10.7150/thno.19217
5. Roberts W. Studies on biogenesis. Philos Trans R Soc London. 1874;164:457-77.
6. Fleming A. A comparison of the activities of antiseptics on bacteria and on leucocytes. Proc Roy Soc Lond [Biol]. 1924; 96(674):171-80.
7. Reddish GF. Methods of testing antiseptics. Transl Res. 1929;14(7):649-58.
8. Fleming A. In vitro tests of penicillin potency. Lancet. 1942;239(6199):732-3. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)70368-0
9. Heatley NG. A method for the assay of penicillin. Biochem J. 1944;38(1):61-5. https://doi.org/10.1042/bj0380061
10. Vincent JG, Whitgrove Vincent H, Morton J. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. Proc Soc Exp Biol Med. 1944;55(3):162-4. https://doi.org/10.3181/00379727-55-14502
11. Mohs FE. A simple quantitative test for the penicillin sensitivity of bacteria: the 'radial streak' method. Transl Res. 1945;30(9):800-2.
12. Frisk AR. Bestamning av penicillin koncentration och

penicillinkänslighet. Nordisk Medicin. 1945;28:2249-52.
13. Hoyt RE, Levine MG. A method for determining sensitivity to penicillin and streptomycin. Science. 1947;106(2747):171. https://doi.org/10.1126/science.106.2747.171
14. Bondi A, Spaulding EH, Smith DE, Dietz CC. A routine method for rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. Am J Med Sci. 1947;213(2):221-5.
15. Frank PF, Wilcox, C, Finland M. In vitro sensitivity of coliform bacilli to seven antibiotics; penicillin, streptomycin, bacitracin, polymycin, aerosporin, aureomycin, and chloromycetin. J Lab Clin Med. 1950;35(2):188-204.
16. Jackson JLW, Dye WE, Mitchell RB. Use of haemoglobin indicator for rapid method of determining antibiotic sensitivity of microorganisms. Texas Rep Biol Med. 1954;12:171-2.
17. Bauer AW, Roberts CE Jr, Kirby WM. Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. Antibiot Annu. 1959-1960;7:574-80.
18. Ericsson H, Svartz-Malmberg G. Determination of bacterial sensitivity in vitro and its clinical evaluation. Antibiot Chemother. 1959;6:41-77. https://doi.org/10.1159/000386647
19. WHO. World Health Organization. Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests. Second Report of the Expert Committee on Antibiotics. WHO Technical Report Series, No. 210. WHO, Geneva; 1961.
20. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45(4):493-6.
21. Ericsson H, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 1971;217:Suppl 217:1.
22. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards Sub-committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Tentative performance standards for antimicrobial susceptibility tests as used in clinical laboratories. In: Balows A (Eds): Current Techniques for Antibiotic Susceptibility Testing. 1974.
23. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-A7. ASM-2. NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova: PA; 1975.
24. Krogstad D, Mollering RC Jr. Antimicrobial combinations. In: Lorian V (Ed.) Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986:537-95.
25. Horrevorts AM, de Ridder CM, Poot MC, et al. Checkerboard titrations: the influence of the composition of serial dilutions of antibiotics on the fractional inhibitory concentration index and fractional bactericidal concentration index. J Antimicrob Chemother. 1987;19(1):119-25. https://doi.org/10.1093/jac/19.1.119
26. Bölmström A, Arvidson S, Ericsson M, Karisson A. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Los Angeles 1988:1209.
27. Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology lab oratory. J Clin Microbiol. 1998;36(8):2169-72.
28. Kocagöz T, Ercis S, Darka Ö, Salmanzadeh-Ahrabi S, Kocagöz S, Hasçelik G. Quicolor: A novel system for rapid antibacterial susceptibility testing. Ann Microbiol. 2007;57:131-5. https://doi.org/10.1007/BF03175062

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):10-20
doi:10.5222/TMCD.2020.010

Araştırma / *Research Article*

Mycobacterium tuberculosis kompleks ve Rifampisin Direncinin Saptanmasında Hızlı Moleküler Yöntemle Konvansiyonel Yöntemlerin Karşılaştırılması

Comparison of a Rapid Molecular Method with Conventional Methods for Identification of Mycobacterium tuberculosis complex and Detection of Rifampicin Resistance

Emre Özkarataş*, Müge Hacer Özkarataş, Ayşe Aydan Özkütük**, Nuran Esen****

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Adana
**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, Haziran 2012-Kasım 2016 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda kullanılan GeneXpert MTB/RIF (GX) testinin Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTK) tanısı ve rifampisin (RIF) direncinin saptanmasındaki performansının mikroskopi ve kültür yöntemleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.*
Yöntem: *Klinik istem doğrultusunda Kinyoun boyalı mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleriyle birlikte GX testi çalışılan 4.199 hasta örneğinin (1361 akciğer, 2.838 akciğer dışı örnek) sonuçları retrospektif olarak çalışmaya alınmıştır.*
Bulgular: *MTK saptanmasında kültür referans yöntem alınarak; GX testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla, tüm örneklerde %74.5 ve %99.1; akciğer örneklerinde %82.7 ve %98.7; akciğer dışı örneklerde %67.2 ve %99.3 olarak hesaplanmıştır. Mikroskopik incelemenin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla, tüm örneklerde %16.4 ve %99.7; akciğer örneklerinde %28.8 ve %99.2; akciğer dışı örneklerde %5.2 ve %99.9 olarak hesaplanmıştır. Tüm örneklerde ve akciğer ile akciğer dışı örneklerde GX testiyle mikroskopik incelemenin duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001). MGIT SIRE yöntemiyle elde edilen RIF duyarlılık sonuçları referans alındığında, GX testinin RIF direncini saptamadaki duyarlılığı %100, özgüllüğü %95.8 olarak hesaplanmıştır.*
Sonuç: *Sonuç olarak, GX testinin kolay uygulanabilirliği, iki saat içinde doğrudan klinik örnekten MTK DNA'sı ve RIF direncini birlikte saptayabilmesi, mikroskopik incelemeye göre duyarlılığının daha yüksek olması göz önünde bulundurulduğunda TB hızlı tanısında yararlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, test sonuçlarının daima kültür yöntemleriyle doğrulanması önerilmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis kompleks, GeneXpert MTB/RIF, moleküler tanı, tüberküloz.*

ABSTRACT

Objective: *In this study, it was aimed to evaluate the performance of GeneXpert MTB/RIF (GX) assay used for the identification of Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) and detection of rifampicin (RIF) resistance in the Central Laboratory of Dokuz Eylul University Hospital between June 2012, and November 2016 by comparing microscopic, and culture methods.*
Method: *The results of 4.199 patient samples (1361 pulmonary and 2838 extrapulmonary) using Kinyoun's staining method for microscopic examinztion, culture methods and GX test as requested by clinics were retrospectively included in t he study.*
Results: *By using culture as the reference method for the detection of MTC; sensitivity and specificity of GX assay were determined as 74.5% and 99.1% for all specimens; 82.7% and 98.7% for pulmonary specimens; 67.2% and 99.3% for extrapulmonary specimens, respectively. The sensitivity and specificity of microscopic examination were found to be 16.4% and 99.7% for all specimens; 28.8% and 99.2% for pulmonary specimens; and 5.2% and 99.9% for extrapulmonary specimens, respectively. The difference between the sensitivities of the GX assay and the microscopic examination was found statistically significant for all samples and for the pulmonary and extrapulmonary samples (p<0.001). By using the drug susceptibility test results of the MGT SIRE as a reference; the sensitivity and specificity of the GX test for detecting RIF resistance was 100% and 95.8%, respectively.*
Conclusion: *In conclusion, GX assay is useful for rapid diagnosis of TB considering that the test is easily applicable and directly detects MTC DNA and resistance to RIF within 2 hours and is superior in sensitivity than microscopic examination. However, test results should always be confirmed by culture methods.*

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis complex, GeneXpert MTB/RIF, molecular diagnosis, tuberculosis*

Alındığı tarih / Received:
10.09.2019 / 10.September.2019
Kabul tarihi / Accepted:
11.10.2019 / 11.October.2019
Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

E. Özkarataş 0000-0003-3578-4725
M. H. Özkarataş 0000-0001-8897-0121
A. A. Özkütük 0000-0002-1710-2287
N. Esen 0000-0001-9796-3003

✉ emreozkaratas@gmail.com

Atıf: Özkarataş E, Özkarataş MH, Özkütük AA, Esen N. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve rifampisin direncinin saptanmasında hızlı moleküler yöntemle konvansiyonel yöntemlerin karşılaştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):10-20.

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), dünya çapında ölümlerin ve tek enfeksiyöz ajan kaynaklı hastalıkların önde gelen nedenlerinden biridir. 2017 yılında yaklaşık 10 milyon yeni TB olgusunun mevcut olduğu, TB nedeniyle 1.3 milyon ölüm olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde 2017 yılı verilerine göre TB'nin insidans hızı yüz binde 17 ve mortalite hızı yüz binde 0.53 olarak verilmiştir[1].

HIV enfeksiyonu sıklığında artış ve aktif TB ile ilişkili oluşu, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) suşlarında birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı gelişen direncin artması mevcut TB epidemisinin devam etmesinin temel nedenleridir[2]. Çok ilaca dirençli-TB (ÇİD-TB) suşları duyarlı suşlarla kıyaslandığında daha yüksek relaps ve mortalite oranlarına sahiptir. ÇİD-TB aynı zamanda yaygın ilaç dirençli-TB'nin (YİD-TB) ortaya çıkması açısından da risk faktörüdür. Bu iki durum dünya çapında TB ve HIV kontrol programlarını olumsuz etkilemektedir[1,2]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, diğer ilaçlara direnç olsun veya olmasın rifampisin (RIF) dirençli-TB (RD-TB) tedavisinde ÇİD-TB olgularındaki gibi ikinci basamak ilaçların kullanılması gerektiği belirtilmektedir[1].

Küresel TB 2018 Raporu'nda; dünya çapında önceden tedavi edilmiş olguların yaklaşık %18'inde ve yeni TB olgularının yaklaşık %3.5'inde, Türkiye'de ise önceden tedavi edilmiş olguların yaklaşık %14'ünde ve yeni TB olgularının %3.3'ünde ÇİD/RD-TB olduğu bildirilmiştir[1].

TB tanısında mikroskopik inceleme ile aside dirençli basil (ARB) aranması, hızlı ve ucuz olmasına karşın, düşük duyarlılığa sahiptir. Kültür tanıda altın standarttır ve ilaç duyarlılık testi (İDT) kültür yöntemleriyle yapılmaktadır. Ancak, kültürün sonuçlanması 2-8 hafta kadar zaman almakta ve ek biyogüvenlik önlemleriyle eğitimli personel gerektirmektedir[2-5]. Örnek alımından sonra ortalama 30 gün içinde İDT sonuçlarının rapor edilmesi gerektiği bildirilmektedir[2,3,6].

MTK ilaç direncinin ve ÇİD/RD-TB suşlarının hızlı tanısı TB hastalarının etkin tedavisini sağlamakta ve ek ilaç direnci gelişimini sınırlamaktadır[2,6]. Günümüzde, tedaviye daha erken başlama olanağı, hastalığın bulaşının azalması ve daha etkin halk sağlığı müdahalelerine olanak sağlamak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) gibi moleküler yöntemler, klinik örnekten hızlı tanıyı desteklemek üzere kullanılmaya başlanmıştır[4,7].

Moleküler çalışmalarla RNA polimerazın beta-alt ünitesini kodlayan rpoB geninin *M. tuberculosis*'de RIF direnciyle ilişkili ana hedef olduğu tanımlanmıştır[8]. GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD) testiyle rpoB geninin MTK spesifik gen bölgesi amplifiye edilerek, hemi-nested gerçek zamanlı-PCR yöntemiyle, klinik örnekte hem MTK varlığı hem de RIF direnci gösterilmektedir. Bakteriyel lizis, nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyon ve amplikon belirlenmesi için gerekli tüm reaktifleri içeren tek kullanımlık plastik bir kartuş içinde MTB/RIF test platformunda (GeneXpert, Cepheid) gerçekleşen ve uygulaması kolay olan bu yöntem yaklaşık iki saat içinde sonuç vermektedir[9].

Bu çalışmada, TB ön tanısı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji Birimi'ne gönderilen klinik örneklerde; MTK tanısı ve RIF direncinin belirlenmesinde GeneXpert MTB/RIF (GX) testinin performansının, boyalı mikroskopik inceleme ve altın standart yöntem olan kültür yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Haziran 2012 ile Kasım 2016 tarihleri arasında, TB ön tanısı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji Birimi'ne gönderilmiş olan mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleri ile birlikte GX testinin çalışıldığı 1.361'i akciğer, 2.838'i akciğer dışı toplam 4.199 örnek çalışmaya dâhil edildi.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji Birimi'ne gelen örneklerden, akciğer örnekleri ve steril olmayan klinik örneklerin homojenizasyon ve dekontaminasyonu N-asetil-L-sistein ve %4'lük sodyum hidroksit yöntemine dayanan Mycoprosafe® (Salubris, Türkiye) ticari kiti kullanılarak yapıldı. Steril olduğu kabul edilen örneklere dekontaminasyon işlemi uygulanmadı. Hazırlanan örneklerden, katı besiyeri olarak Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri (Becton Dickinson, ABD) ve sıvı besiyeri olarak "Mycobacteria Growth Indicator Tube" (MGIT) kullanılarak (Becton Dickinson, ABD) üretici talimatlarına göre ekim yapıldı. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar Kinyoun yöntemi ile boyanarak ARB varlığı açısından ışık mikroskobunda değerlendirildi. LJ besiyerlerinin üremeleri sekiz hafta boyunca haftada bir kez kontrol edilerek, sıvı besiyerleri BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) sistemi ile 37°C'de altı hafta inkübe edilerek sürdürüldü. Bu süre sonunda üreme olmayan örnekler negatif olarak değerlendirildi. Üreme olan besiyerlerinden hazırlanan yayma preparatların mikroskopik incelemesinde ARB görülmesi durumunda MTK ile tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) ayrımı amacıyla MTK'ye ait MPT64 antijenini saptamaya yönelik bir test olan "TBC Identification Test" (Becton Dickinson, ABD) üretici talimatlarına göre uygulandı ve yorumlandı. MTK olarak tanımlanan izolatların ilaç duyarlılığı BACTEC MGIT 960 SIRE yöntemi (Becton Dickinson, ABD) ile üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. GX testi ise üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı.

MTK için kültür pozitifliği referans alınarak, GX testi ve mikroskopik incelemenin duyarlılık, özgüllük, pozitif öngörü değeri (PÖD) ve negatif öngörü değeri (NÖD) hesaplandı. GX testi ve mikroskopik inceleme sonuçları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olup olmadığı McNemar testi kullanılarak araştırıldı. BACTEC MGIT 960 SIRE yöntemi ile elde edilen İDT sonuçları referans alındığında, GX testinin RIF direncini saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü incelendi. Bu inceleme yapılırken, GX testinde MTK DNA'sı saptanmayan örnekler, MTK DNA'sı saptanıp RIF direnci belirsiz olan örnekler ve MGIT SIRE yöntemi ile İDT sonucu var olmayan örneklere (geçersiz sonuç veya kültürde üreme olmaması) ait sonuçlar araştırma dışı tutuldu. p değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Ver. 15, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı. Araştırmada Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayı (08.05.2019 tarih, 2019/12-06 No.) alınmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda merkez laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklere uygulanan Kinyoun boyalı mikroskopik inceleme, kültür ve GX testi sonuçları retrospektif olarak karşılaştırıldı.

Çalışmaya dâhil edilen 4.199 örnekten 1361'i (%32.4) akciğer, 2.838'i (%67.6) akciğer dışı örneklerden oluşmaktaydı. Akciğer örneklerinin; %36.6'sı (498) balgam, %30.3'ü (412) bronş lavaj (BL), %14.8'i (202) bronkoalveolar lavaj (BAL), %12.1'i (165) açlık mide sıvısı (AMS) ve %6.2'si (84) trakeal sekret (TS) örneğiydi. Akciğer dışı örneklerin; %47.9'u (1359) steril vücut sıvısı, %27.2'si (771) doku örneği, %10.7'si (305) abse ve aspirasyon materyali, %8.2'si (234) idrar örneği, %2'si (56) kemik iliği örneği, %1.9'u (53) kan örneği ve %2.1'i (60) ise diğer örnekler (dışkı, sürüntü örnekleri gibi) idi. Steril vücut sıvılarının, %43.4'ü (590) plevra sıvısı, %33.7'si (458) beyin omurilik sıvısı (BOS), %10'u (136) periton sıvısı, %7.2'si (98) eklem sıvısı ve %5.7'si (77) perikard sıvısı örneğiydi. Doku örneklerinin; %82.1'i (633) doku biyopsi örneği, %17.1'i (132) lenf nodu biyopsisi ve %0.8'i (6) plevral biyopsi örneğiydi.

Çalışmaya dâhil edilen 4.199 örneğin 110'unda (%2.6) kültürde MTK üremesi saptanırken, bunların 52'si (%47.3) akciğer örneklerinden, 58'i (%52.7) ise akciğer dışı örneklerden oluşmaktaydı. Kültürde MTK üremesi saptanan 110 örneğin GX testi ile 82'sinde MTK DNA'sı saptanırken (%74.5), mikroskopik incelemede 18'inde (%16.4) ARB görüldü. Çalışmaya alınan

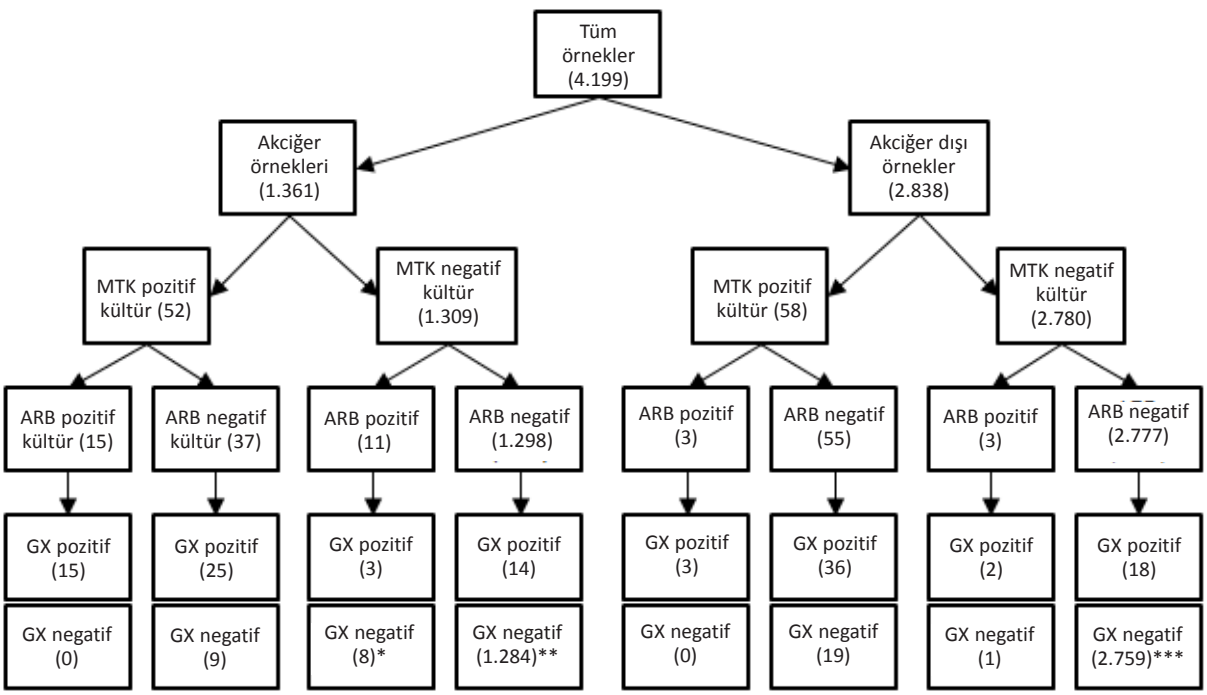
Tablo 1. Akciğer örneklerinin kültür, mikroskopi ve GeneXpert MTB/RIF testi sonuçları.

	Pozitif MTK kültürü				Negatif MTK kültürü				
	ARB (+)		ARB (-)		ARB (+)		ARB (-)		
Örnek türü	**GX (+)**	**GX (-)**	**GX (+)**	**GX (-)**	**GX (+)**	**GX (-)**	**GX (+)**	**GX (-)**	**Toplam**
Balgam	10	0	11	4	2	4	8	459	498
Bronş lavajı	5	0	11	5	1	4	5	381	412
Bonkoalveolar lavaj	0	0	3	0	0	0	0	199	202
Açlık mide suyu	0	0	0	0	0	0	0	165	165
Trakeal aspirat	0	0	3	0	0	0	1	80	84
Akciğer örnekleri (tümü)	15	0	28	9	3	8	14	1284	1361

MTK: Mycobacterium tuberculosis kompleks; GX: GeneXpert MTB/RIF

örneklerin 32'sinde (%0.8) mikroskopik incelemede ARB pozitifliği var olup, bunların 26'sı (%81.2) akciğer örneği, 6'sı (%18.8) ise akciğer dışı örnek idi. mikroskopik incelemede ARB görülen örneklerin 18'inde (%56.3) kültürde MTK üremesi saptanırken, ARB pozitif beş örneğin (%15.6) kültürde TDM üremesi mevcuttu, dokuz örnekte (%28.1) ise inkübasyon süresi sonunda üreme olmadı. Örneklerin 119'unda (%2.8) GX testi ile MTK DNA'sı saptandı. Bunların 60'ı (%50.4) akciğer örneği, 59'u (%49.6) ise akciğer dışı örnek idi. GX testi ile MTK DNA'sı saptanan örneklerin 82'sinde (%68.9) kültürde MTK üremesi mevcut olup, 37'sinde (%31.1) inkübasyon süresi sonunda üreme olmadı (Şekil 1). Örnek türlerinin kültür, mikroskopi ve GX testi sonuçları Tablo 1 (Akciğer örnekleri) ve Tablo 2 (akciğer dışı örnekler)'de gösterilmektedir.

Örneklerin 41'inde (%1) kültürde TDM üremesi saptandı. Bunlardan mikroskopik inceleme sonucunda, beş örnekte ARB (%12.2) görülürken, 36'sında (%87.8) ARB görülmedi. Kültürde TDM üreyen örneklerin hiçbirinde GX testi ile MTK DNA'sı saptanmadı, çapraz reaktivite gözlenmedi.



Beş örneğin kültür sonucu TDM, **29 örneğin kültür sonucu TDM, * 7 örneğin kültür sonucu TDM.*

Şekil 1. Örneklerin kültür, ARB mikroskopi ve GeneXpert MTB/RIF (GX) testi sonuçları.

Tablo 2. Akciğer dışı örneklerin kültür, mikroskopi ve GeneXpert MTB/RIF testi sonuçları.

	Pozitif MTK kültürü				Negatif MTK kültürü				
	ARB (+)		ARB (-)		ARB (+)		ARB (-)		
Örnek türü	GX (+)	GX (-)	GX (+)	GX (-)	GX (+)	GX (-)	GX (+)	GX (-)	Toplam
Plevra sıvısı	0	0	2	3	0	0	0	585	590
BOS	0	0	6	3	0	0	2	447	458
Periton	0	0	0	1	0	0	0	135	136
Eklem sıvısı	0	0	0	0	0	0	0	98	98
Perikard sıvısı	0	0	0	0	0	0	0	77	77
Doku biyopsisi	1	0	6	4	0	0	7	615	633
Lenf nodu	2	0	1	6	0	0	0	123	132
Plevral biyopsi	0	0	0	0	0	0	0	6	6
Abse/aspirasyon materyali	0	0	18	1	2	1	4	279	305
İdrar	0	0	1	0	0	0	2	231	234
Kemik iliği	0	0	0	1	0	0	0	55	56
Kan	0	0	1	0	0	0	0	52	53
Diğer örnekler	0	0	1	0	0	0	3	56	60
Akciğer dışı örnekler (tümü)	3	0	36	19	2	1	18	2759	2.838

MTK: Mycobacterium tuberculosis kompleks; GX: GeneXpert MTB/RIF

Tablo 3. Kültür referans yöntem alınarak MTK saptanmasında GeneXpert MTB/RIF (GX) testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif öngörü (PÖD) ve negatif öngörü (NÖD) değerleri (%).

Test - Örnek tipi	Duyarlılık	Özgüllük	PÖD	NÖD
GX testi - Tüm örnekler	74.5	99.1	68.9	99.3
GX testi - Akciğer örnekleri	82.7	98.7	71.7	99.3
GX testi - Akciğer dışı örnekler	67.2	99.3	66.1	99.3
GX testi - ARB pozitif örnekler	100.0	64.3	78.3	100.0
GX testi - ARB negatif örnekler	69.6	99.2	66.7	99.3

Tablo 4. Kültür referans yöntem alınarak MTK saptanmasında mikroskopik incelemenin duyarlılık, özgüllük, pozitif öngörü (PÖD) ve negatif öngörü (NÖD) değerleri (%).

Test - Örnek tipi	Duyarlılık	Özgüllük	PÖD	NÖD
Mikroskopik inceleme - Tüm örnekler	16.4	99.7	56.3	97.8
Mikroskopik inceleme - Akciğer örnekleri	28.8	99.2	57.7	97.2
Mikroskopik inceleme - Akciğer dışı örnekler	5.2	99.9	50.0	98.1

MTK saptanmasında kültür referans yöntem alınarak, GX testinin duyarlılığı %74.5, özgüllüğü %99.1, PÖD %68.9 ve NÖD %99.3 olarak (Tablo 3); mikroskopik incelemenin duyarlılığı %16.4, özgüllüğü %99.7, PÖD %56.3 ve NÖD %97.8 olarak (Tablo 4) bulundu.

Tüm örneklerde ve akciğer ile akciğer dışı örneklerde GX testi ile mikroskopik incelemenin duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

Akciğer örneklerinde GX testinin duyarlılığı; balgamda %84 (21/25) ve BL'de %76.2 (16/21) saptanırken, kültürde MTK üremesi saptanan üç adet BAL ve üç adet TS örneklerinin tümünde GX testi pozitif bulunmuştur.

Akciğer dışı örneklere ait GX testinin duyarlılığı; abse-aspirasyon materyallerinde %94.7 (18/19), doku biyopsisinde %63.6 (7/11) ve lenf nodu biyopsisinde %33.3 (3/9) olmak üzere tüm doku örneklerinde %50 (10/20) olarak saptanırken, kültürde MTK üremesi saptanan dokuz BOS örneğinin altısında, beş plevra sıvısının ikisinde, bir idrar ve bir kan örneğinde GX testi pozitif bulunmuştur. Ancak kültürde MTK üremesi bulunan bir periton sıvısı ve bir kemik iliği örneğinde GX testi negatif sonuç vermiştir.

Mikroskopik incelemede ARB görülen ancak kültürde üremesi olmayan ve GX testi ile MTK DNA'sı saptanmayan dört örnekten birinin örneklenmesi sırasında hastanın anti-TB tedavi aldığı saptandı. mikroskopik incelemede ARB görülen ve GX testinde MTK DNA'sı saptanan, ancak kültürde üremesi olmayan beş örneğin tamamında hastaların örnek alımı sırada anti-TB tedavi aldığı izlendi. GX testi ile MTK DNA'sı saptanan, ancak mikroskopik incelemede ARB görülmeyen

Tablo 5. MGIT SIRE yöntemi ve GeneXpert MTB/RIF testi ile elde edilen RIF duyarlılık sonuçları (n).

	MGIT SIRE yöntemi		
GX testi	**RIF dirençli**	**RIF duyarlı**	**Toplam**
MTK DNA'sı saptandı - RIF direnci saptandı	1	3	4
MTK DNA'sı saptandı - RIF direnci saptanmadı	0	69	69
Toplam	1	72	73

ve kültürde üremesi olmayan 32 örnekten 18'inin örnek alındığı sırada ilgili hastaların anti-TB tedavisi altında olduğu saptandı.

Kültürde MTK üremesi saptanan 110 örneğe MGIT SIRE yöntemi ile İDT yapıldı, bunların 14'ünde sonuç geçersiz bulundu. Geri kalan 96 örnekten ikisinde MGIT SIRE yöntemi ile RIF dirençli bulundu, GX testi ile bunlardan birinde RIF direncini belirleyen mutasyon saptandı, diğerinde ise MTK DNA'sı saptanmadığı için RIF direnciyle ilişkili mutasyon belirlenemedi. MGIT SIRE yöntemi ile RIF duyarlı olan 94 örnekten 73 (%77.7)'ünde GX testi ile MTK DNA'sı saptandı. Yetmiş üç örneğin birinde (%1.4) RIF direnci belirsiz olup, üçünde (%4.1) RIF direncini belirleyen mutasyon saptandı, geri kalan 69 örnekte (%94.5) RIF direncini belirleyen mutasyon saptanmadı. Her iki testle de RIF duyarlılık sonucu elde edilen örneklere ait sonuçlar Tablo 5'te gösterilmektedir. GX testinin RIF direncini saptamada duyarlılığı %100, özgüllüğü %95.8, PÖD %25 ve NÖD %100 olarak bulundu.

TARTIŞMA

Tüberküloz tanısında yaygın olarak kullanılan konvansiyonel laboratuvar yöntemlerinden direkt mikroskopik inceleme hızlı ve ucuz olmasına karşın, tanıda düşük duyarlılığa sahiptir. Tanıda altın standart olan kültür yöntemi ise zaman alıcı olup, ek biyogüvenlik önlemleriyle eğitimli personel gerektirmektedir[2-5]. Günümüzde, tedaviye daha erken başlama olanağı, hastalığın bulaşının azalması ve daha etkin halk sağlığı müdahalelerine olanak sağlamak amacıyla moleküler yöntemler, klinik örnekten hızlı tanıyı desteklemek üzere kullanılmaktadır[7]. 2010 yılından itibaren, erişkinlerde akciğer TB tanısında, 2013 yılından itibaren ise çocuklarda ve akciğer dışı TB'nin bazı özel formlarının tanısında başlangıç testi olarak kullanımı DSÖ tarafından önerilen GX testiyle rpoB geninin MTK spesifik gen bölgesi amplifiye edilerek, hemi-nested gerçek zamanlı-PCR yöntemiyle, klinik örnekte hem MTK varlığı hem de RIF direnci gösterilmekte ve uygulaması kolay olan bu yöntem yaklaşık iki saat içinde sonuç vermektedir[1,9]. Bu çalışmada, rutin inceleme için laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklerde, MTK tanısı ve RIF direncinin belirlenmesinde GX testinin etkinliği, boyalı mikroskopik inceleme ve altın standart yöntem olan kültür yöntemleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, MTK için kültür pozitifliği referans alındığında, tüm örnekler için GX testinin duyarlılığı %74.5, özgüllüğü %99.1 olarak bulundu. Bu alanda yapılan ulusal çalışmalara bakıldığında, Gürsoy ve ark.[10] tarafından GX testinin duyarlılığı %73.3, özgüllüğü %99.3; Özkütük ve ark.[11] tarafından GX testinin duyarlılığı %73.9, özgüllüğü %98.6; Zeka ve ark.[4] tarafından GX testinin duyarlılığı %79.7, özgüllüğü %98.2 olarak çalışmamızdakine benzer şekilde bulunmuş, Albay ve ark.[12] tarafından, GX testinin duyarlılığı %95, özgüllüğü %99; Çiftçi ve ark.[13] tarafından GX testinin duyarlılığı %96, özgüllüğü %98 olarak saptanmış, testin duyarlılığı çalışmamızdan daha yüksek bulunmuştur. Albay ve ark.[12] ile Çiftçi ve ark.[13] tarafından yapılan çalışmalarda, örnek sayılarının çalışmamızdakiyle kıyaslandığında oldukça az olması, iki çalışmada da kültürde MTK üremesi saptanan ve mikroskopik incelemede ARB görülen örnek oranının çalışmamızdan daha yüksek olması, testin duyarlılığının daha yüksek saptanmasına neden olabilecek etkenlerdir.

Dünyanın birçok bölgesinde yapılmış çalışmalarda, GX testinin tanı performansı açısından oldukça değişken duyarlılık sonuçları elde edilmiştir[14-18]. Bu değişkenlik çalışmaya alınan örneklem boyutu, çalışma grubundaki TB insidansı, akciğer ve akciğer dışı örnek türlerinin dağılımı, örnek kalitesi ve çalışmalarda mikroskopik incelemede ARB görülen örnek oranındaki farklara bağlı olmaktadır[9-11,15-18]. Çalışmamızda, GX testinin duyarlılık sonucuna, örneklerin yalnızca %0.8'inin mikroskopik incelemesinde ARB görülmesi ve örnek grubunun büyük kısmının akciğer dışı örneklerden oluşmasının etki etmiş olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, örneklerin %32.4'ü akciğer örneklerinden oluşmaktadır. Akciğer örnekleri için GX testinin duyarlılığı %82.7, özgüllüğü %98.7 bulundu. Aralarında meta-analizlerin de bulunduğu dünyada yapılan çeşitli çalışmalarda, akciğer örneklerinde GX testinin duyarlılığı %58-100, özgüllüğü %86-100 arasında geniş bir yelpazede dağılmaktadır[5,16,19,20].

Çalışmalarda, duyarlılık sonuçlarının değişkenlik göstermesinin akciğer örneklerinin de türü ve dağılımı arasındaki farklılıktan kaynaklandığı bildirilmektedir. Çalışmamızdaki 1361 akciğer örneğinin 498'i balgam, 412'si BL, 202'si BAL, 165'i AMS ve 84'ü TS örneğidir. Çalışmamızda, solunum yolu örnek türlerinde GX testinin duyarlılığı, balgamda %84 (21/25) ve BL'de %76.2 (16/21) saptanırken, MTK için kültür pozitifliği saptanan çalışmaya dâhil az sayıdaki (üçer örnek) BAL ve TS örneklerinin hepsinde GX testi pozitif bulunmuştur. Sharma ve ark.[20] tarafından yapılan çalışmada, GX testinin farklı akciğer örneklerindeki tanı performansı araştırılmış ve bronşial yıkama, öksürükle çıkarılan balgam, BAL, endotrakeal aspirat ve indüklenmiş balgam örneklerinde testin duyarlılığı sırasıyla %100 (2/2), %96.9 (380/392), %90 (18/20), %87.5 (14/16) ve %84.2 (16/19) olarak bulunmuş, öksürükle çıkarılan balgam örneklerinde duyarlılığın daha yüksek olduğu bildirilmiş fakat bronşiyal yıkama ve indüklenmiş balgam örneklerinin sayısının azlığından dolayı bu örneklerde testin tanı değeri tam olarak yorumlanamamıştır. Parcell ve ark.[19] tarafından akciğer örnekleriyle yapılan bir çalışmada, testin duyarlılığı balgam örneklerinde %95.3 ve BAL örneklerinde %100 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, BAL örneklerinde elde edilen duyarlılık sonuçlarının bahsi geçen çalışmalarla uyumlu olduğu, balgam örneklerinde ise GX testinin duyarlılığının, Sharma ve ark.[20] ile Parcell ve ark.[19] tarafından yapılan çalışmalara göre düşük olduğu gözlenmektedir. Çalışmamızda kültürde MTK üremesi saptanıp GX testi ile MTK DNA'sı saptanmayan balgam örneklerinin tümü ARB negatif örneklerdi. Bu örneklerde düşük basil yükü, yalancı negatif sonuçlara yol açarak testin duyarlılığına etki etmiş olabilir. Geleta ve ark.'nın[21] yaptığı bir çalışmada, balgam örneklerinde GX testinin duyarlılığı %65.5 olarak çalışmamızdakinden düşük bulunmuş ve düşük duyarlılığa çalışma dizaynı, metodolojik farklılıklar ve ARB negatif örneklerdeki olası PCR inhibisyonu veya yetersiz nükleik asit içeriğinin neden olabileceğinden bahsedilmiştir.

Çalışmamızda, akciğer dışı örnekler, tüm örneklerin %67.6'sını oluşturmaktadır. Çalışmamızda, akciğer dışı örnekler için GX testinin duyarlılığı %67.2 ve özgüllüğü %99.3 olarak bulunmuş, bu değerlerin ülkemizde yapılan benzer çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür[10,11]. Kohli ve ark.[15] tarafından 66 çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde, akciğer dışı örneklerde GX testinin havuzlanmış duyarlılığının farklı örnek türlerinde %31-97 arasında, havuzlanmış özgüllüğünün ise %82-99 arasında değiştiği belirtilmiştir. Akciğer dışı örneklerde GX testinin duyarlılığının çalışılan örnek türlerinin oldukça çeşitli olmasına, örnekteki mikobakteriyel yükü yansıtan yayma durumuna, örneklem boyutuna, çalışılan hasta grubuna ve örnek işlemleme prosedürüne bağlı değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir. Li ve ark.[14] tarafından 106 çalışmanın incelendiği bir meta-analizde, çalışmamızdakine benzer olarak testin duyarlılığının akciğer örneklerinde akciğer dışı örneklere göre yüksek bulunduğunun vurgulanması bu testin akciğer örnekleri için daha uygun olduğunu düşündürmektedir. Düşük duyarlılık, özellikle ARB negatif bulunan örneklerde akciğer dışı TB tanısını dışlamada testin kullanımını kısıtlamaktadır[15,18].

Çalışmamızdaki 2.838 akciğer dışı örneğin, 590'ı plevra sıvısı, 458'i BOS, 136'sı periton sıvısı, 98'i eklem sıvısı ve 77'si perikard sıvısı olmak üzere 1359'u steril vücut sıvısı, 771'i doku (633'ü doku biyopsisi, 132'si lenf nodu biyopsisi ve 6'sı plevral biyopsi), 305'i abse ve aspirasyon materyali, 234'ü idrar, 56'sı kemik iliği, 53'ü kan ve 60'ı diğer örneklerden oluşmaktadır. Çalışmamızda, akciğer dışı örnek türlerinde GX testinin duyarlılığı; abse-aspirasyon materyallerinde %94.7 (18/19), doku biyopsisinde %63.6 (7/11) ve lenf nodu biyopsisinde %33.3 (3/9) olmak üzere tüm doku örneklerinde %50 (10/20) olarak bulunurken, kültürde MTK üremesi saptanan dokuz BOS örneğinin altısında, beş plevra sıvısının ikisinde, bir idrar ve bir kan örneğinde GX testi ile pozitiflik saptanmıştır. Ancak kültürde MTK üremesi bulunan bir periton sıvısı ve bir kemik iliği örneklerinde ise pozitiflik saptanmamıştır. Tadesse ve ark.[22] tarafından 572 akciğer dışı örnekle yapılan bir çalışmada, kültür referans alındığında GX testinin duyarlılığı; lenf nodu örneklerinde %94.4, BOS örneklerinde %75, plevral sıvı örneklerinde %69, peritoneal sıvı örneklerinde %71 ve toplamda %91 olarak çalışmamızdan yüksek bulunmuştur. Laboratuvarımızda TB tanı testlerinin genellikle tarama amacıyla istenmesine karşın konusu geçen çalışmada, hasta grubunun özellikle TB şüpheli hastalardan seçilmesi ayrıca kültür pozitifliği (%39.5) ile ARB pozitifliği (%20.9) oranlarının çalışmamızdan oldukça yüksek olması duyarlılık sonuçlarındaki farklılığı açıklayabilir. Huo ve ark.[23] tarafından 23 çalışma dâhil edilerek plevral sıvı örneklerinde GX testinin uygunluğunun değerlendirildiği bir meta-analizde; testin duyarlılığı %30 olarak çalışmamıza benzer şekilde düşük bulunmuştur. Aynı meta-analizde; GX testinin plevral sıvı örneklerinde düşük duyarlılığının PCR inhibisyonu ve uygunsuz veya yetersiz örnekleme yöntemlerinden kaynaklanabileceği belirtilmiş, testin TB tanısını dışlamada değerinin düşük olduğundan sözsedilmiştir[23]. Mazzola ve ark.[24] tarafından yapılan çalışmada, akciğer dışı örneklerde altın standart olarak klinik tanı temel alınarak GX testinin duyarlılığı; BOS örneklerinde %100, biyopsi örneklerinde %83.6 ve BOS dışı kaviter sıvı örneklerinde %53.6 olarak çalışmamızdan yüksek bulunmuş; püy örneklerinde %95.6 ve plevral sıvı örneklerinde ise %38 olarak çalışmamızdakine benzer saptanmıştır. Çalışmamızda, doku örneklerinde duyarlılığın düşük olması, örnek homojenizasyonunun tam olarak sağlanamamasından ve örnek içeriğinden kaynaklı olası PCR inhibisyonundan kaynaklanmış olabilir. Çalışmamızda, kültürde MTK üremesi saptanan BOS ve diğer steril vücut sıvısı örneklerinin tümünün ARB negatif olması göz önünde bulundurulduğunda, bu örnek türlerinde mikobakteriyel yükün az olmasına bağlı olarak duyarlılığın düşük bulunduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, DSÖ özellikle hızlı tanının yaşamsal olacağı TB menenjit kuşkulu hastalarda BOS örneklerinde GX testinin başlangıç testi olarak tercih edilmesi gerektiğini önermektedir[25].

GX testinin değerlendirildiği çalışmalarda elde edilen sonuçlardaki değişkenliğin en önemli nedenlerinden biri çalışılan örneklerin mikroskopi sonuçlarıdır[14,16,18,25]. Çalışmamızda örneklerin %0.8'inde (32/4.199) mikroskopik incelemede ARB görülmüştür. Çalışmamızda, GX testinin ARB pozitif örneklerde duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %64.3; ARB negatif örneklerde duyarlılığı %69.6 ve özgüllüğü %99.2 olarak bulundu. GX testinin klinik örnekte analitik saptama sınırı, 131 CFU/mL olarak bildirilmiştir[17]. GX testi ile MTK DNA'sının saptanması, örnekteki mikobakteriyel yüke bağlı olup, düşük mikobakteriyel yükü işaret eden ARB negatifliği testin duyarlılığını etkilemektedir. Ayrıca, Özkütük ve ark.[11], ARB negatif örneklerde GX testi ile duyarlılığın düşük bulunmasının, sıvı ve katı olmak üzere iki farklı kültür yönteminin birlikte kullanılması ile kültür duyarlılığının artmış olmasına bağlı olabileceğini belirtmiştir.

Çalışmamızda, GX testi ile yalancı pozitif sonuç elde edilen 37 örneğin (%0.9), 17'si akciğer (10 balgam, altı BL, bir TS), 20'si akciğer dışı örneklerden (yedi doku biyopsisi, altı abse/aspirasyon materyali, üç diğer örnekler, iki BOS ve iki idrar) oluşmaktadır. Bu 37 örnek incelendiğinde, 23 örneğin alındığı sırada hastaların TB tanısı nedeniyle anti-TB tedavi aldığı gözlemlenmiş, bu örneklerde tedavi sonrası ölü basil

DNA'sına bağlı GX testi ile MTK DNA'sı saptandığı düşünülmüştür. Ayrıca bu örneklerden beşinde ARB pozitifliği saptanmıştır. Albay ve ark.[12] tarafından yapılan çalışmada, bir BAL örneğinde ve bir lenf nodu biyopsisinde GX testi ile yalancı pozitif sonuç elde edilmiş; BAL örneği araştırıldığında, hastanın geçmişinde TB öyküsü olduğu, ancak uzun süredir ilaç tedavisi almadığı ve klinik iyileşmenin sağlandığı öğrenilmiştir. Dolayısı ile bu pozitifliğin ölü basil DNA'sına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Özkütük ve ark.[11] tarafından yapılan çalışmada, GX testi ile 34 örnekte (%1.3) yalancı pozitiflik saptanmış, yalancı pozitif örneklerin ait olduğu hastalar araştırıldığında, 20'sinin daha önceki örneklerinde kültürde üreme olduğu, TB tanısı ile anti-TB tedavi aldığı saptanmıştır. Chang ve ark.[17] tarafından 15 çalışmanın değerlendirildiği meta-analiz sonuçlarına göre GX testinin yalancı pozitiflik oranı %1.6 olarak belirlenmiş ve yalancı pozitifliğin TB öyküsü olan hastalarda ölü basil DNA'sına veya subklinik relapsa bağlı olabileceği belirtilmiştir. Theron ve ark.[26] tarafından yapılan çalışmada, yalancı pozitifliğin daha çok TB tanı ve tedavi öyküsü olan olgularda olduğu ve düşük mikobakteriyel DNA yüküyle ilgili olduğu belirtilmiş ayrıca testin canlı basiller dışında ölü basillere ait DNA'yı da saptadığına dikkat çekilmiştir. Bununla birlikte, Hillemann ve ark.[27], GX sisteminde kapalı reaksiyon ortamına bağlı olarak kontaminasyon riski düşük olmasına rağmen, kontaminasyonun da yalancı pozitifliğin nedeni olabileceğini belirtilmiştir.

Çalışmamızda, GX testi ile yalancı negatif sonuç elde edilen 28 örneğin dokuzu (%25.5) akciğer (beş BL, dört balgam), 19'u akciğer dışı örneklerden (altı lenf nodu, dört doku biyopsisi, üç plevra sıvısı, üç BOS, bir periton sıvısı, bir abse/aspirasyon materyali, bir kemik iliği) oluşmaktadır. Bu örneklerin tamamında düşük mikobakteriyel yükün göstergesi olarak ARB negatifliğinin var olmasının yanı sıra özellikle doku örneklerinde homojenizasyonun istenilen düzeyde sağlanamamış olması, GX testinin yalancı negatif sonuç vermesine neden olmuş olabilir. Chang ve ark. tarafından yapılan meta-analizde GX testinin yalancı negatiflik oranı %9.6 olarak belirlenmiş, kültür ile örnekteki 10-100 basil/mL kadar az miktardaki mikroorganizmanın saptanabilmesi ve GX testinin saptama alt sınırının 131 CFU/mL olması nedeniyle yalancı negatif sonuçların ortaya çıkabileceği belirtilmiştir[17].

Çalışmamızda, MTK için kültür pozitifliği referans alınarak GX testi ve mikroskopik incelemenin duyarlılıkları sırasıyla, tüm örneklerde %74.5 ve %16.4; akciğer örneklerinde %82.7 ve %28.8; akciğer dışı örneklerde %67.2 ve %5.2 olarak bulundu. İki testin de özgüllüğü yüksek bulundu. Tüm örneklerde, akciğer ile akciğer dışı örneklerde GX testi ile mikroskopik incelemenin duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Neticede, kültürde MTK üremesi saptanan 110 örneğin 92'sinde ARB görülmemekle birlikte GX testi ile bu örneklerin 64'ünde (%69.6) MTK DNA'sı saptanarak hızlı tanı olanağı sağlanmıştır.

Doğrudan klinik örnekten RIF dirençli ile ilişkili mutasyonları saptayabilmesi, GX testinin önemli bir avantajıdır. RIF dirençli suşların %90-95'inde rifampisin direncini belirleyici bölge (RRDR; rifampicin resistance determining region) olarak bilinen rpoB geninin 81 baz çiftlik bölgesinde mutasyon gözlenmesi, duyarlı izolatlarda ise bu mutasyonun olmaması nedeniyle RIF, moleküler İDT için ideal hedeftir. RIF dirençli izolatlar aynı zamanda %85-90 izoniazid (INH) dirençli olduğundan, RIF direnci ÇİD-TB tanısı için bir marker olarak kullanılabilmektedir[2]. Çalışmamızda, GX testinin RIF direncini saptamada duyarlılığı %100, özgüllüğü %95.8, PÖD %25 ve NÖD %100 bulundu. Steingart ve ark.[16] tarafından yapılan meta-analizde, GX testinin RIF direncini saptamada duyarlılığı %33-100, özgüllüğü %83-100 arasında değişirken, toplam duyarlılık %95, özgüllük %98 olarak hesaplanmış ve testin yalancı dirençli ve yalancı duyarlı sonuçlara neden olabileceği belirtilmiştir. Boehme ve ark.[28] tarafından yapılan çalışmada, GX testinin RIF direncini saptamasında çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilmiş, testin düşük PÖD'ye sahip olması nedeniyle özellikle ÇİD-TB prevalansının düşük olduğu bölgelerde konvansiyonel yöntemlerle

doğrulama testi yapılmasının gerekli olduğu üzerinde durulmuştur. Rahman ve ark.[29] tarafından 92 balgam örneğiyle yapılan çalışmada GX testi ile fenotipik İDT sonuçları arasında çalışmamızla benzer olarak %93.5 uyum bulunmuş, fenotipik ve moleküler İDT arasındaki uyumsuzluğun moleküler yöntemlerle olguların daha dirençli saptanmasına bağlı olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir. Buna neden olarak, moleküler yöntemlerin fenotipik İDT'yi etkilemeyen sessiz mutasyonları saptayabilmesi ve GX testinin döngü eşiği "cycle threshold" (Ct) değerleri arasındaki farkı temel alarak direnci öngören kantitatif bir yöntem olmasından dolayı bu testle kalitatif yöntemlerden daha değişken sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir[29]. Bunsow ve ark.[5] tarafından yapılan çalışmada, çalışmamızdakine benzer sonuçlar elde edilmiş, yalancı dirençli sonuçların (3/8) fenotipik İDT ile ilişkili olmayan kodon 514'teki sessiz mutasyona bağlı olabileceği düşünülmüş ve örneklerin birinde mutasyon saptanmıştır. Çalışmamızda, GX testi ile yalancı dirençli bulunan örneklere dizi analizi yapılamadığı için uyumsuzluğun nedeni tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Çalışmamızda, GX testinin RIF direncini saptamadaki performansı hesaplanırken örnek sayısının az olması ve testlerden birinde RIF duyarlılığı sonucunun mevcut olmadığı durumlarda örneklerin ileri analizinin yapılamaması çalışmamızın en büyük kısıtlılığıdır.

Sonuç olarak, GX testinin mikroskopik incelemede, ARB görülen örneklerde TB tanısında güvenilir bir yöntem olduğu, özellikle solunum yolu dışı örnekler olmak üzere az sayıda basil içeren mikroskopik incelemede ARB görülmeyen örneklerde ise duyarlılığının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Testin kolay uygulanabilirliği ve çok fazla deneyim gerektirmemesi, iki saat gibi kısa bir sürede doğrudan klinik örnekten MTK DNA'sı ve RIF direncini birlikte saptayabilmesi, mikroskopik incelemeye göre duyarlılığının daha yüksek olması göz önünde bulundurulduğunda TB hızlı tanısında oldukça yararlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar testin kullanımı hususunda DSÖ önerilerini desteklemektedir. Ancak, TB tanısında GX testi daima altın standart kültür yöntemlerini destekleyerek kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. WHO. Global tuberculosis report, 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respir Med. 2009;103(12):1777-90. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.07.010
3. TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). Aydoğdu Ofset Matbaacılık. Ankara, 2014.
4. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4138-41. https://doi.org/10.1128/JCM.05434-11
5. Bunsow E, Ruiz-Serrano MJ, López Roa P, Kestler M, Viedma DG, Bouza E. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in clinical specimens. J Infect. 2014;68(4):338-43. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.11.012
6. American Thoracic Society, CDC; Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis. MMWR Recomm Rep. 2003;52(RR-11):1-77.
7. CDC. Centers for Disease Control and Prevention, Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009;58(1):7-10.
8. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993;341(8846):647-50. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90417-F
9. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med. 2010;363(11):1005-15. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907847
10. Gürsoy NC, Yakupoğulları Y, Tekerekoğlu MS, Otlu B. Klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis*'in saptanması ve rifampin direncinin tespitinde Xpert MTB/RIF testinin tanısal performansının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2016;50(2):196-204. https://doi.org/10.5578/mb.21033
11. Özkütük N, Sürücüoğlu S. Orta prevalanslı bölgede akciğer ve akciğer dışı tüberküloz tanısında Xpert MTB/RIF testinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2014;48(2):223-32. https://doi.org/10.5578/mb.7456
12. Albay A, Güney M, Tekin K, Kısa Ö, Sığ AK. Pulmoner ve

ekstrapulmoner örneklerde tüberkülozun erken tanısı ve rifampisin direncinin tespiti için GeneXpert MTB/RIF testinin değerlendirilmesi. Cukurova Med J. 2016;41(3): 548-53.
https://doi.org/10.17826/cukmedj.237514

13. Çiftçi IH, Aslan MH, Aşık G. Klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* varlığının gösterilmesinde Xpert MTB/RIF sonuçlarının değerlendirilmesi Mikrobiyol Bul. 2011;45(1):43-7.
14. Li S, Liu B, Peng M, et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2017;12(7):e0180725. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180725
15. Kohli M, Schiller I, Dendukuri N, et al. Xpert® MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance. Cochrane Database Syst Rev. 2018;8:CD012768. https://doi.org/10.1002/14651858.CD012768.pub2
16. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2014;(1):CD009593. https://doi.org/10.1002/14651858.CD009593.pub3
17. Chang K, Lu W, Wang J, et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. J Infect. 2012;64(6):580-8. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.02.012
18. Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, Lawn SD. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. BMC Infect Dis. 2014;14:709. https://doi.org/10.1186/s12879-014-0709-7
19. Parcell BJ, Jarchow-MacDonald AA, Seagar AL, Laurenson IF, Prescott GJ, Lockhart M. Three year evaluation of Xpert MTB/RIF in a low prevalence tuberculosis setting: A Scottish perspective. J Infect. 2017;74(5):466-72. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.02.005
20. Sharma SK, Kohli M, Yadav RN, et al. Evaluating the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay in pulmonary tuberculosis. PLoS One. 2015;10(10): e0141011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141011
21. Geleta DA, Megerssa YC, Gudeta AN, Akalu GT, Debele MT, Tulu KD. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis in sputum specimens in remote health care facility. BMC Microbiol. 2015;15:220. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0566-6
22. Tadesse M, Abebe G, Bekele A, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a diagnostic evaluation study. Clin Microbiol Infect. 2019;25(8):1000-5. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.018
23. Huo ZY, Peng L. Is Xpert MTB/RIF appropriate for diagnosing tuberculous pleurisy with pleural fluid samples? A systematic review. BMC Infect Dis. 2018;18(1):284. https://doi.org/10.1186/s12879-018-3196-4
24. Mazzola E, Arosio M, Nava A, Fanti D, Gesu G, Farina C. Performance of real-time PCR Xpert ®MTB/RIF in diagnosing extrapulmonary tuberculosis. Infez Med. 2016;24(4):304-9.
25. WHO. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: Policy Update. Geneva: World Health Organization; 2013.
26. Theron G, Venter R, Calligaro G, et al. Xpert MTB/RIF results in patients with previous tuberculosis: Can we distinguish true from false positive results? Clin Infect Dis. 2016;62(8):995-1001. https://doi.org/10.1093/cid/civ1223
27. Hillemann D, Rüsch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. J Clin Microbiol. 2011;49(4):1202-5. https://doi.org/10.1128/JCM.02268-10
28. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. Lancet. 2011;377(9776):1495-505. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60438-8
29. Rahman A, Sahrin M, Afrin S, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF Assay and GenoType MTBDRplus DNA probes for detection of mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2016;11(4):e0152694. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152694

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):21-6
doi:10.5222/TMCD.2020.021

Araştırma / *Research Article*

Yetişkinlerde Solunum Yolu Viral Etkenlerinin 2010-2018 Yılları Arasındaki Prevalansı ve Mevsimsel Dağılımı

Prevalence and Seasonal Distribution of Respiratory Viruses in Adults Between 2010-2018

Mert Ahmet Kuşkucu*, Bilgül Mete, Fehmi Tabak**, Kenan Midilli***

*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
**İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) olan erişkinlerde yaygın solunum yolu virüslerinin etiyolojik rolü ve epidemiyolojik profilinin belirlenmesi amacıyla Ocak 2010 - Haziran 2018 tarihleri arasında üniversite hastanemize ait sekiz yıllık retrospektif veriler sunulmuştur.*
Yöntem: *Çalışmaya 788 ASYE hastasından alınan nazofarengeal sürüntü örnekleri dâhil edildi. Örneklere influenza virüsleri (A, B) para-influenza virüsleri (PIV) 1-4, insan rinovirüsleri (hRV), solunum sinsityal virüsü (RSV) A/B, insan metapnömovirüs (hMPV), insan koronavirüsleri (hCoV; OC43, 229E, NL63 ve HKU), adenovirüs (ADV), enterovirüslar (EV), parekhovirüs ve insan bokavirüs (hBOV) dâhil olmak üzere sık görülen yaygın solunum yolu virüslerinin araştırılması için çoklu PCR yöntemi (2010-2016, Seeplex® RV15 ACE Detection Kit, SeeGene Kore, 2016-2018, FTD Respiratory pathogens 21 Kit, Fast Track Diagnostics Ltd Malta) kullanıldı.*
Bulgular: *Hasta örneklerinin %51.78'inde viral patojenler belirlendi ve hastaların %7.23'ünde birden fazla virüs pozitif bulundu. İnfluenza virüsleri saptanan dominant ajanlardı (toplam %16.88; A %11.42 ve B %5.46 idi), ardından hRV (%14.85), hCoV (%8.63), RSV (%7.11), hMPV (%4.06), ADV (%3.93), PIV (%3.55) saptandı. EV ve hBOV de bu grupta %1'in altında belirlendi. Mevsimsel olarak değerlendirildiğinde influenza A virüsünün kış aylarında, influenza B'nin ilkbahar döneminde, hRV'nin ilk ve sonbaharda, hCOV'nin yaz aylarında, RSVA/B'nin kış döneminde, PIV'ın yaz-sonbahar döneminde, hMPV ve ADV'nin kış döneminde daha sık saptanan etkenler olduğu gözlendi.*
Sonuç: *Çoklu moleküler testler yetişkinlerde görülen solunum yolu enfeksiyonlarında viral etkenlerin rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu enfeksiyonlarda etkene yönelik tanıyla viral ajanın belirlenmesinin, doğru tedavi uygulaması ile antibiyotiklerin gereksiz kullanımını engellemekte yararlı olacağı ve enfeksiyon kontrol önlemleri için hızlı ve doğru yönetim kararlarının alınmasını sağlayacağını düşünmekteyiz.*

Anahtar kelimeler: *Solunum yolu virüsleri, çoklu PCR, epidemiyoloji*

ABSTRACT

Objective: *In this study, we present retrospectively collected data in our university hospital that covers an-8-year period from January 2010 to June 2018 to determine the epidemiological and etiological profile for common respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections (ARTIs).*
Method: *Nasopharyngeal swab samples from 788 ARTI patients were analysed by multiplex PCR method (2010-2016, Seeplex® RV15 ACE Detection Kit, SeeGene Korea, 2016-2018 FTD Respiratory pathogens 21 Kit, Fast Track Diagnostics Ltd Malta) for common respiratory viruses, including influenza viruses A, B, para-influenza virus (PIV) 1-4, human rhinovirus (hRV), respiratory syncytial virus (RSV) A/B, human metapneumovirus (hMPV), human coronavirus (hCoV; OC43, 229E, NL63, and HKU), adenovirus (ADVs), enterovirus (EV), parechovirus and human bocavirus (hBOV).*
Results: *Viral pathogens were detected in 51.78% of patient samples and 7.23% of patients were positive for multiple viruses. Influenza viruses were the dominant pathogenic agents detected (16.88% in total, RSV A, 11.42% and RSV B, 5.46%), followed by hRVs (14.85%), hCoVs (8.63%), RSV A/B (7,11%), hMPV (4.06%), ADVs (3.93%), PIV (3.55%). EVs and hBOV were also detected in this group at less than 1%. It was observed that influenza A virus was detected more frequently in winter, influenza B in the spring, hRV in spring and autumn months, coronaviruses in summer, RSV A/B f in winter, PIVs in summer, and autumn, and hMPVs and ADVs in winter.*
Conclusion: *Multiple molecular tests provide a better understanding of the role of viral agents in respiratory infections among adults. We think that the diagnosis of the causative agent and the detection of the viral agent in these infections will be beneficial in preventing unnecessary use of antibiotics with proper treatment and will ensure making quick and accurate management decisions for infection control measures.*

Keywords: *Respiratory system viruses, multiplex PCR, epidemiology*

Alındığı tarih / Received:
19.08.2019 / 19.August.2019
Kabul tarihi / Accepted:
16.10.2019 / 16.October.2019
Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

M. A. Kuşkucu 0000-0001-8735-5725
B. Mete 0000-0001-9091-6087
F. Tabak 0000-0001-8632-2825
K. Midilli 0000-0003-3007-3422

✉ kuskucum@gmail.com

Atıf: Kuşkucu MA, Mete B, Tabak F, Midilli K. Yetişkinlerde solunum yolu viral etkenlerinin 2010-2018 yılları arasındaki prevalansı ve mevsimsel dağılımı. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):21-6.

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan virüslerin erişkin bireylerde morbidite ve mortalitenin nedeni olmasının yanı sıra epidemi hatta pandemilere yol açabilmeleri nedeni ile toplum sağlığı üzerine de ciddi etkileri bulunabilmektedir[1-3]. Solunum yolu enfeksiyonlarının %22-59'undan virüslerin sorumlu olduğu bildirilmektedir[4,5]. Bu virüslere ait epidemiyolojik veriler coğrafi ve mevsimsel farklılıklar göstermektedir[3]. Gelişen teknolojinin kullanım imkanları da bu virüslerin epidemiyolojilerine ait verilerin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Özellikle influenza tip A ve B'nin (IFN-A, IFN-B) yanı sıra insan rinovirüslerinin (hRV) saptanma oranları ve toplum sağlığı üzerine etkileri ülkemizde giderek daha çok önem kazanmaktadır[1,3,6]. Son yıllarda, solunum virüslerinin aynı anda saptandığı çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) rutin viroloji tanı laboratuvarında sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Sonuç olarak bu çalışmalar, uygun antimikrobiyal tedaviye geçiş için önemli veriler sağlamakta, gereksiz antibiyotik kullanım oranlarının azaltarak antibiyotik direnci ile savaşmaya da yardımcı olmaktadır[7]. Solunum virüslerinin epidemiyolojisine yönelik daha önce yapılan araştırmaların çoğu alt solunum yolu enfeksiyonları ve hastanede yatan pediatrik hastalarla ilgili veriler olup, poliklinik hastaları ve erişkinlerle ilgili veriler daha az sayıdadır. Bu çalışmada, yaklaşık 8 yıllık süre içerisinde, merkezimize gönderilen nazofarengeal sürüntü örneklerinde erişkin hastalarda solunum virüslerinin sıklığının ve mevsimsel dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

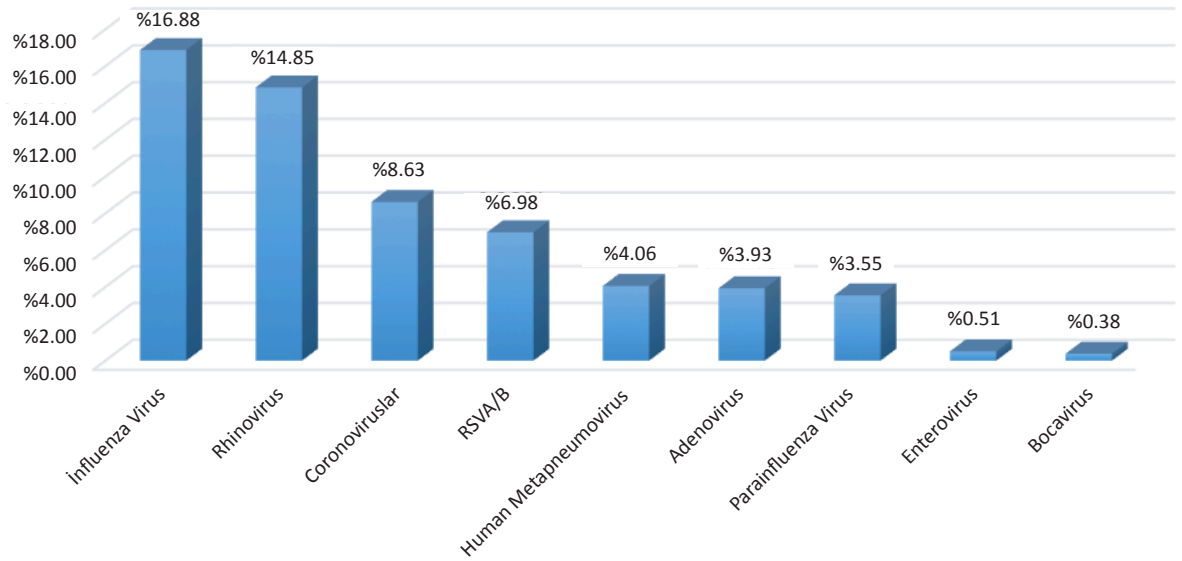
Ocak 2010 - Haziran 2018 yılları arasında akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan 788 nazofarengeal sürüntü örneği alındı. Sürüntü örnekleri alındıktan sonra örnek transfer medyumuna (UTM™ Viral Transport Media, Copan, İtalya) konuldu ve laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarda örnekler vortekslendikten sonra 300 µl alınarak ticari kit ile (EZ1 Virus Mini Kit, Qiagen, Almanya) nükleik asit izolasyonu üretici firma direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen nükleik asit örneklerinde influenza A/B, insan rhinovirüsü (hRV), solunum sinsityal virüsü A/B (RSV), insan koronavirüsleri (hCoV; C229, OC43, C-NL63, HKU), insan metapnömovirüs (hMPV), parainfluenzavirüs (PIV) 1/2/3/4, adenovirüs (ADV), insan bokavirüs (hBOV), enterovirüs ve parechovirüs varlığı revers transkripsiyon sonrası çoklu PCR yöntemi ile ticari kit kullanılarak (2016 yılına kadar Seeplex® RV15 ACE Detection Kit, SeeGene Kore, 2016 yılından sonra FTD Respiratory pathogens 21 Kit, Fast Track Diagnostics Ltd Malta) üretici firma direktifleri doğrultusunda araştırıldı. Hastalara ait demografik verilerin değerlendirilmesi, viral etkenlerinin sıklıklarının ve mevsimsel dağılımlarının belirlenmesi için istatistik analizleri IBM SPSS Statistics Ver.21 ve MS Excel 2016 yazılımları kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen 788 hastanın 383'ü (%48.61) erkek, 405'i (%51.39) kadındı. Hastaların yaş ortalaması 45.38±19.09, erkek hastaların yaş ortalamaları 44.05±17.81 (minimum 18 maksimum 89), kadın hastaların yaş ortalamaları 46.63±20.12 (minimum 18 maksimum 95) idi. Örneklerin 408'inde (%51.78) en az bir viral etken saptanırken, 57'sinde (%7.23) çoklu etkenler saptandı. Çoklu etken saptanan örneklerin 51'inde (%6.47) ikili etken, beşinde (%0.63) üçlü etken ve birinde (%0.13) dörtlü etken saptandı. Bununla birlikte, 380 örnekte (%48.22) herhangi bir etken saptanmadı. Örneklerde sırası ile en çok IFN-A/B virüs (n=133, %16.88) (IFN-A n=90; %11.42, B n=43 %5.46), saptanırken ikinci sıklıkta hRV (n=117, %14.85) ve üçüncü sıklıkta hCoV(n=68, %8.63) (C229 n=26, %3.30, C-OC43 n=24, %3.05, C-NL63 n=13, %1.65, HKU n=5, %0.63) saptandı. Daha az sıklıkta saptanan virüsler sırası ile RSVA/B (n=55, %6.98), hMPV (n=32, %4.06), ADV (n=31, %3.93), PIV (n=28, %3.55) (PIV-1 n=5, %0.63, PIV-2 n=4, %0.51, PIV-3 n=15, %1.90, PIV-4 n=4, %0.51), EV (n=4, %0.51) ve hBOV (n=3, %0.38) saptandı. Parechovirüs hiçbir örnekte saptanmadı (Tablo 1, Grafik 1).

Tablo 1. Örneklerde etken saptama sıklıkları ve saptanan etkenlerin dağılımı.

	N	%	Virus	N	%	Saptanan etkenler içindeki oranı (%)
Etken Saptanan Örnek Sayısı	408	51.78	IFN-A/B hRV	133 117	16.88 14.85	32.60 28.68
Çoklu Etken Saptanan Örnek Sayısı	57	7.23	hCoV RSVA/B	68 55	8.63 6.98	16.67 13.48
2'li Etken Saptanan Örnek Sayısı	51	6.47	hMPV ADV	32 31	4.06 3.93	7.84 7.60
3'lü Etken Saptanan Örnek Sayısı	5	0.63	PIV EV	28 4	3.55 0.51	6.86 0.98
4'lü Etken Saptanan Örnek Sayısı	1	0.13	hBOV	3	0.38	0.74



Grafik 1. Örneklerde saptanan etkenlerin dağılımı.

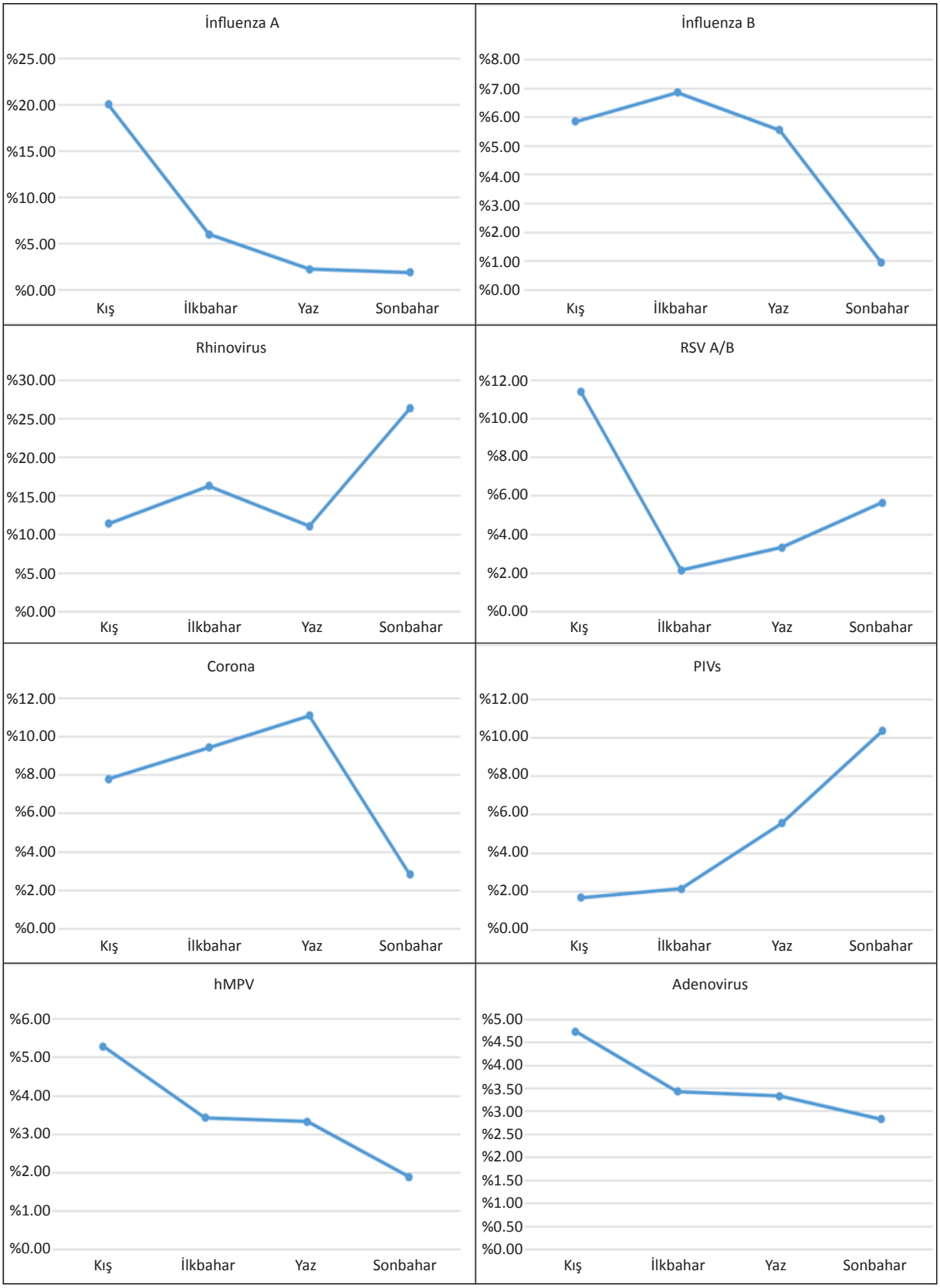
Tablo 2. Viral etkenlerin mevsimlere göre dağılımı (%).

	Kış	İlkbahar	Yaz	Sonbahar
IFN-A	20.06	6.01	2.22	1.89
IFN-B	5.85	6.87	5.56	0.94
hRV	11.42	16.31	11.11	26.42
RSVA/B	11.42	2.15	3.33	5.66
hCoV	7.80	9.44	11.11	2.83
PIV	1.67	2.15	5.56	10.38
hMPV	5.29	3.43	3.33	1.89
ADV	4.74	3.43	3.33	2.83

Virüslerin mevsimsel dağılımları incelendiğinde IFN-A virüsünün en sık kış aylarında, IFN-B'nin ilkbahar döneminde hRV'nin ilk ve sonbaharda, hCoV'un yaz aylarında RSVA/B'nin kış döneminde, PIV'ın yaz-sonbahar döneminde, hMPV ve ADV'nin kış döneminde daha sık saptandığı gözlendi (Tablo 2, Grafik 2).

TARTIŞMA

Solunum yolu enfeksiyonları, hastaneye gitmeyi gerektiren, tedavi, hastanede yatışla birlikte iş gücü kaybına neden olabilen, bu bakımdan büyük ekonomik yük oluşturabilen ve dünyada en yaygın görülen enfeksiyon hastalıklarının arasındadır[8]. Bununla birlikte, yetişkinlerde solunum yolunda etken virüslerin solunum yolu enfeksiyonlarında rolünün son yıllarda ilgi çekmektedir. Bu çalışmada, yaklaşık 8 yıllık süreyi kapsayan çalışmada 18 yaş üstü erişkin bireylerde



Grafik 2. Viral etkenlerin mevsimlere göre dağılımı.

akut solunum yolu enfeksiyonu yakınmaları ile hastaneye başvuran kişilerde solunum yolu viral etkenlerinin sıklığı ile mevsimsel dağılımları irdelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, örneklerin %51.78'inde en az bir viral etken saptanırken örneklerin %48.22'sinde herhangi bir etken saptanmamıştır. Bu da çoklu PCR gibi bir yöntem kullanılsa bile solunum yolu enfeksiyonu olan kişilerin yaklaşık yarısında viral etyoljik ajan gösterilemediğini ortaya koymaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, bu oranlar erişkinler için poliklinik hastalarında %35, yatış yapılan hastalarda %65 olarak bildirilmiştir[5]. Yine benzer biçimde Özışık ve ark.[9] yaptıkları çalışmada, 106 örneğin 56'sında (%52.8) viral etken saptarlarken 50 örnekte (% 47.2) herhangi bir viral etken saptamamışlardır.

İnfluenzanın neden olduğu pnömonilerde ciddi solunum yetmezliği görülebilmekte hatta bu tablolar ölümle sonuçlanabilmektedir. Buna karşın, diğer solunum yolu virüslerinin rolü günümüzde yeterince araştırılmamış konular arasında yer almaktadır. Son yıllarda hRV bu açıdan dikkat çekicidir ve bazı çalışmalarda en sık saptanan viral etkenler olarak bildirilmektedirler[9-11]. Bu çalışmada, hRV (n=117, %14.85) ikinci sıklıkta saptanan patojenler olmuşlardır.

Çalışmada, virüslerin mevsimsel dağılımları, yurdumuzdan ve dünyadan bildirilen mevsimsel dağılım verileri ile uyumludur. Buna göre IFN-A en sık kış aylarında görülmekte ve bunu ilkbahar döneminde IFN-B takip etmektedir. hRV aktivitesi özellikle ilk ve sonbaharda görülmekle birlikte, aktiviteleri tüm yıla yayılmış biçimdedir. hCOV'ların dört farklı tipinin (OC43, NL63, 229E ve HKU) dünya çapında dolaşımda olduğu bilinmektedir. Bu virüslerden OC43, HKU1 ve NL63'ün Kasım-Temmuz ayları arasında, 229E'nin tüm yıl boyunca dolaşımda olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada bölgemizde hCOV yaz aylarında daha yaygın saptandığı gözlenmiştir[8]. RSV'nin ılıman bölgelerde kış ve ilkbahar başlangıcında salgınlara neden olabildiği bildirilse de aktivitesi yerel olarak değişebilmektedir[12]. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, virüsün aralık ve ocak aylarında en sık gözlendiği bildirilmektedir. Bu çalışmada, RSVA/B'nin kış döneminde en sık saptanmıştır. Önemli konulardan biri benzer klinik bulgulara yol açabilecek hMPV kış döneminde daha sık saptanabilmektedir[8,13]. Daha çok ilkbahar ve sonbahar aylarında görülen PIV aktivitesinin bölgemiz için yaz-sonbahar döneminde yüksek olduğu gözlenmiştir[8].

Moleküler yöntemler özellikle çoklu formatlarda uygulandıklarında bu hasta grubunda etkenin saptanması için önemli bir tanısal araç olarak kullanılmaktadır. Bu gibi testler ile tanı koyabilme kabiliyetinin %90'a varan oranlarda arttığı gösterilmiştir[14]. Doğru tanı bu hastaların yönetiminde özellikle antibiyotiklerin doğru şeklide kullanılmasını da sağlamaktadır. Günümüzde güçlü tanı yöntemlerine rağmen viral solunum yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %25-50 gibi ciddi bir oranında uygun olmayan biçimde antibiyotik kullanımının olduğu düşünülmektedir ve antibiyotik kullanımında en belirleyici faktör kesin tanı sorunudur[15,16]. Uygun biçimde yapılacak sürveyanslar ile birlikte çoklu/hızlı tanı testleri uygun olmayan antibiyotik kullanımını azaltabilecektir.

Sonuç olarak, çoklu PCR gibi birden fazla etkenin aynı anda bakılmasını sağlayabilen teknolojiler ile erişkinlerde virüslerin neden olduğu solunum yolları enfeksiyonlarının etiyolojisi daha anlaşılabilir hâle gelmiş olsa da özellikle örnek alımı ve test formatlarının epidemiyolojik ve klinik veriler ile belirlenmesi gerekmektedir. Influenza gibi antiviral tedavisi olan etkenlerin neden olduğu viral enfeksiyonlarda uygulanacak tedavinin seçilmesi ve gereksiz antibiyotik kullanımlarından kaçınılması hem antibiyotik direnç gelişiminin önlenmesinde yararlı olacak hem de tedavi maliyetleri üzerine olumlu etkilerde bulunabilecektir. Bununla birlikte, bu enfeksiyonlardan korunma için alınacak izolasyon önlemlerinin ivedilikle alınmasını sağlayarak oluşabilecek nozokomiyal ya da toplumsal epidemilerin sınırlanması sağlanabilecektir. Yine virüslerin mevsimsel dinamiklerini ortaya koyan bu çalışmanın özellikte hızlı test uygulamaları için doğru zaman aralıklarının seçimine ve test performansları-

nın değerlendirilmesinde katkıda bulunacağını ön görmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Lieberman D, Shvartzman P, Lieberman D, et al. Etiology of respiratory tract infection in adults in a general practice setting. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998;17(10):685-9. https://doi.org/10.1007/s100960050161
2. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin Infect Dis. 2007;44(Suppl 2):S27-72. https://doi.org/10.1086/511159
3. Wu X, Wang Q, Wang M, et al. Incidence of respiratory viral infections detected by PCR and real-time PCR in adult patients with community-acquired pneumonia: a meta-analysis. Respiration. 2015;89(4):343-52. https://doi.org/10.1159/000369561
4. Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, ve ark. Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin prevalansı ve mevsimsel dağılımı, 2002-2014. Mikrobiyol Bul. 2015;49(2):188-200. https://doi.org/10.5578/mb.9024
5. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):74-98. https://doi.org/10.1128/CMR.00032-09
6. Louie JK, Hacker JK, Gonzales R, et al. Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. Clin Infect Dis. 2005;41(6): 822-8. https://doi.org/10.1086/432800
7. Semret M, Schiller I, Jardin BA, et al. Multiplex respiratory virus testing for antimicrobial stewardship: A prospective assessment of antimicrobial use and clinical outcomes among hospitalized adults. J Infect Dis. 2017;216(8):936-44. https://doi.org/10.1093/infdis/jix288
8. Bayrakdar F, Altaş AB, Korukluoğlu G. Solunum yolu virüslerinin 2009-2012 yılları arasında ülkemizdeki mevsimsel dağılımı. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2013;43(2):56-66. https://doi.org/10.5222/TMCD.2013.056
9. Özışık L, Durusu Tanrıöver M, Çıblak Akçay M, et al. İnfluenza benzeri hastalık nedeniyle hastaneye yatış gerektiren hastalarda mortaliteyle ilişkili faktörler. Mikrobiyol Bul. 2017;51(1):20-31. https://doi.org/10.5578/mb.43419
10. Ruuskanen O, Jarvinen A. What is the real role of respiratory viruses in severe community-acquired pneumonia? Clin Infect Dis. 2014;59(1):71-3. https://doi.org/10.1093/cid/ciu242
11. Musher DM, Thorner AR. Community-acquired pneumonia. N Engl J Med. 2014;371(17):1619-28. https://doi.org/10.1056/NEJMra1312885
12. Karron RA, Wright PF, Belshe RB, et al. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. J Infect Dis. 2005;191(7):1093-104. https://doi.org/10.1086/427813
13. Hacımustafaoglu M. RSV infeksiyonları. Ankem Derg. 2014;28(Ek 2):E33-44. https://doi.org/10.5222/ankem.2014.044
14. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2010;50(2):202-9. https://doi.org/10.1086/648678
15. Harris AM, Hicks LA, Qaseem A, et al. Appropriate antibiotic use for acute respiratory tract infection in adults: Advice for high-value care from the American College of Physicians and the Centers for Disease Control and Prevention. Ann Intern Med. 2016; 164(6):425-34. https://doi.org/10.7326/M15-1840
16. Shapiro DJ, Hicks LA, Pavia AT, Hersh AL. Antibiotic prescribing for adults in ambulatory care in the USA, 2007-09. J Antimicrob Chemother. 2014;69(1):234-40. https://doi.org/10.1093/jac/dkt301

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):27-34
doi:10.5222/TMCD.2020.027

Araştırma / *Research Article*

pADU94, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü

pADU94, a Cloning and Expression Vector with Chloramphenicol Resistance Marker

Hanife Salih, Erman Oryaşın, Bülent Bozdoğan

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Uygulama ve Araştırma Merkezi (REDPROM), Aydın

ÖZ

Amaç: *Günümüzde genellikle ampisilin ve kanamisin direnç geni içeren vektörler klonlama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın temel amacı, farklı bir direnç markırı, kloramfenikol direnç geni taşıyan, beta-laktam direnç genlerinin de klonlanabileceği bir vektör oluşturmaktır.*
Yöntem: *Çalışmada, vektör omurgası için pUC19 ve transformasyon için Escherichia coli DH10B kullanılmıştır. pUC19 plazmidi bla geni haricinde invers PCR yoluyla çoğaltılmış ve vektör omurgası olarak kullanılmıştır. Bu omurgaya kloramfenikol direnç geni (cat) eklenmiştir. Oluşan pADU94 plazmidi E. coli DH10B bakterisine aktarılmış ve transformantlar 10 µg/ml kloramfenikol içeren besiyerinde seçilmiştir. Konstrüksiyonu yapılan pADU94 vektörününe bla, gfp ve tsst klonlanmıştır. Klonlanan genlerin ekspresyonu gfp için UV altında yeşil parlamanın varlığı ile test edilmiş ve bla için penisilin inaktivasyonu modifiye Hodge testiyle gösterilmiştir.*
Bulgular: *Oluşturulan pADU94 vektörü E. coli DH10B bakterisine aktarılmış, plazmid varlığı ekstraksiyonla doğrulanan transformantlarda kloramfenikol minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerinin 2 µg/ml'den 64 µg/ml'ye çıktığı saptanmıştır. pADU94 içerisine bla, gfp ve tsst genlerinin klonlandığı M13 PCR ve plazmid ekstraksiyonuyla doğrulanmıştır. E. coli DH10B'ye bla geni aktarılması ile ampisilin MİK düzeyi 8 µg/ml'den ≥128 µg/ml'ye çıkmıştır. Ayrıca klonlanan beta-laktamaz geninin işlevselliği modifiye Hodge testiyle doğrulanmıştır. pADU94 plazmidiyle mavi-beyaz seçilim yapılabileceği tsst geninin klonlanmasıyla gösterilmiş ve beyaz kolonilerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak tsst geninin insert olarak varlığı doğrulanmıştır. Klonlanan gfp geninin eksprese olduğu ise UV altında yeşil parlama görülmesiyle doğrulanmıştır.*
Sonuç: *Elde edilen sonuçlara göre, konstrükte edilen kloramfenikol direnç geni markırı içeren pADU94 vektörü, mavi-beyaz koloni seçimi ve gen ekspresyonu kapasitesine sahip bir vektördür. pADU94 vektörünün gen ekspresyonunda ve DNA fragman klonlanmasında kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu plazmidin ayrıca bilinmeyen beta-laktam direnç genlerinin klonlanarak karakterize edilmesinde ya da bilinen beta-laktam direnç genlerinin klonlama vasıtasıyla özelliklerinin araştırılmasında kullanılabilecek uygun bir vektör olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile farklı direnç markırlı vektörlerin laboratuvarda nasıl oluşturulabileceği okurların bilgisine sunulmuştur.*

Anahtar kelimeler: *Klonlama vektörü, antibiyotik direnci, kloramfenikol, cat*

ABSTRACT

Objective: *Nowadays, the vectors with ampicillin and kanamycin resistance genes are widely used to construct a new vector with chloramphenicol -resistance marker that may be used for cloning of the beta- lactam resistance genes.*
Method: *In this study, pUC19 was used for vector backbone amplification and E. coli DH10B for plasmid transformation. Vector backbone for pADU94 was amplified from pUC19 by inverse PCR by excluding bla gene. Chloramphenicol-resistance gene (cat) was amplified by PCR and ligated to the vector backbone. The constructed pADU94 plasmid was transferred into E. coli DH10B bacteria and the transformants were selected on agar medium containing h 10 µg/ml chloramphenicol. The bla, gfp ve tsst genes were amplified by PCR and cloned into pADU94. The expressions of the cloned genes were tested with the presence of the green fluorescence under the UV for gfp and the penicillin inactivation was demonstrated with modified Hodge test for bla.*
Results: *The constructed pADU94 vector was transferred into E. coli DH10B and plasmid extraction was done to show presence of pADU94 in transformants for which the MIC value for chloramphenicol was increased from 2 µg/ml to 64 µg/ml. Also, the functionality of the cloned beta lactamase gene was confirmed using modified Hodge test. By cloning tsst gene it has been demonstrated that selection between blue, and white could be realized using f pADU94 plasmid, vector and presence of tsst gene as an insert was verified by plasmid extraction from white colonies. The expression of the cloned gfp gene was verified with observation of green fluorescence under UV light.*
Conclusion: *According to the obtained results, the constructed pADU94 vector with chloramphenicol resistance marker is a vector that is capable of selecting blue- white colonies and expressing gene. It was shown that pADU94 vector can be used for gene expression and cloning of DNA fragment. The vector has been found to be a suitable vector that can also be used to characterize unknown beta-lactam resistance genes or to investigate the properties of known beta-lactam resistance genes by way of cloning. With this article a method for construction of vectors with different resistance markers in a laboratory were submitted for the use of rreaders.*

Keywords: *Cloning vector, antibiotic resistance, chloramphenicol, cat*

Alındığı tarih / Received:
29.07.2019 / 29.July.2019

Kabul tarihi / Accepted:
21.10.2019 / 21.October.2019

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

H. Salih 0000-0003-2141-0669
E. Oryaşın 0000-0003-1242-7434
B. Bozdoğan 0000-0003-2469-9728

✉ hanifesalih94@gmail.com

Atıf: Salih H, Oryaşın E, Bozdoğan B. pADU94, kloramfenikol direncine sahip klonlama ve ekspresyon vektörü. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):27-34.

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Günümüzde, pUC türevi vektörler, *Escherichia coli* bakterisine DNA klonlama deneylerinde en yaygın kullanılan vektörlerdendir. Bu vektörün avantajları ise; yüksek kopya sayılı olması, çoklu klonlama bölgesinde çeşitli restriksiyon enzim kesim bölgeleri içermesi ve mavi-beyaz görüntüleme ile insert almış plazmidin belirlenebilmesidir[1]. Bu vertörlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlardan biri, pUC19 vektörünün içerdiği beta-laktam direnç geni *(bla)* nedeniyle, başka bir beta-laktam direnç geninin klonlanmasına olanak vermemesidir[2]. Bir diğer dezavantaj ise, vektördeki sinyal peptidi içeren beta-laktamaz enziminin konak hücre tarafında hücre dışına salgılamasıyla koloni etrafında ampisilinsiz bölge oluşması ve plazmid içermeyen "satellite" kolonilerin de transformantların yanında çoğalarak yalancı pozitif sonuçlara neden olmasıdır. Aynı nedenle, sıvı besiyerinde ampisilinin etkisiz metabolitlerine dönüştürülmesi, plazmidi içermeyen bakterilerin içerenlerden daha hızlı üremesiyle besiyerinde hâkimiyet kazanmalarına neden olabilmektedir[3].

Kloramfenikol antibiyotiği, bakteri ribozomunun 50S altünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe eder[4]. Kloramfenikol direnci sağlayan kloramfenikol asetil transferaz enzimi ise kloramfenikolü asetilleyerek ribozomun 50S alt ünitesine bağlanmasını engellemektedir[5]. Kazandırdığı direncin yanı sıra *cat* geni farklı promotörlerin aktivitesini belirlenmesi için reporter gen olarak da kullanılabilmektedir[6]. pBC KS/SK(-/+) vektör serisi gibi kloramfenikol direnç genini markır olarak içeren ticari vektörler (Agilent vb.) bulunmaktadır.

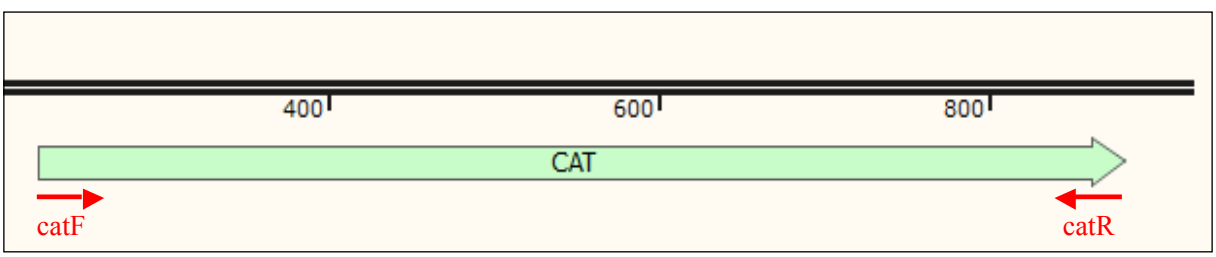
Bu çalışmanın temel amacı, markır olarak kloramfenikol direnç geni içeren, çoklu klonlama bölgesi bütünlüğü bozulmamış ve mavi-beyaz görüntüleme imkanı veren yeni bir vektör inşa etmek ve araştırmacıların hizmetine sunmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kloramfenikol direnç geninin PCR yoluyla çoğaltılması: Kloramfenikol dirençli *Staphylococcus aureus* ADU-M38 suşu triptik soy agar (TSA) katı besiyerine ekilerek gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen petriden tek bir koloni triptik soy broth (TSB) sıvı besiyerine ekilerek gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir. Kültürlenmiş bakteriden fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış ve etanol presipitasyonu ile elde edilen DNA saflaştırılmıştır. Elde edilen DNA'dan *cat* geni yeni dizayn edilen primer çifti yardımıyla (Tablo 1) Tablo 2'deki koşullarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır (Şekil 1).

Ampisilin direnç geni içermeyen plazmid omurgasının PCR yoluyla çoğaltılması: pUC19 plazmidinden markırsız plazmid omurgası çoğaltmak için dizayn edilen spesifik primerlerle (Tablo 1) Tablo 2'de belirtilen koşullarda çoğaltılmıştır.

Amplikonların kütleştirilmesi ve 5' uçlarının fosforilasyonu: Taq polimerazla çoğaltılan plazmid omurgası ve *cat* amplikonunun 3' ucundaki adenin nükleotidi uzantısı T4 DNA polimeraz enzimi ile kütleştirilmiştir. Bu amaçla her iki amplikon örneğinden 14 µl alınmış ve 1 µl T4 DNA polimeraz (1U), 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı (8 mM) eklenerek 20 dakika boyunca 11°C'de inkübe edilmiştir. Kütleştirilen amplikonlar fenol-kloroform-isoamil



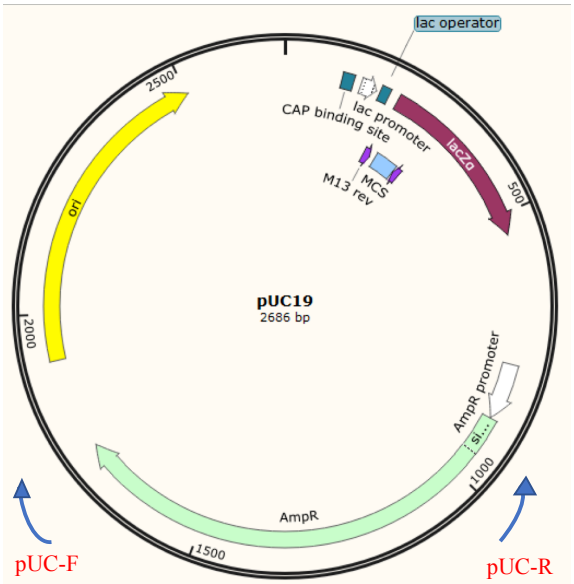
Şekil 1. Kloramfenikol direnç geninin PCR yoluyla çoğaltılması ve primerlerinin lokasyonu.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler ve sekansları.

Primer Adı	Sekansı	Referans
cat-F	5′ – ATGACTTTTAATATTATTG – 3′	Bu çalışma
cat-R	5′ –AATCCGCGGCTAAATCCAATCATCTAC– 3′	Bu çalışma
omg-F	5′ – CTGTCAGACCAAGTTTAC – 3′	Bu çalışma
omg-R	5′ – ACTCATACTCTTCCTTTTTC– 3′	Bu çalışma
bla-F	5′ –GCACTTTTCGGGGAAATGTG– 3′	Bu çalışma
bla-R	5′ –GACAGTTACCAATGCTTAAT– 3′	Bu çalışma
gfp-F	5′ – GAGGATCCAATGAGTAAAGGAGAAG – 3′	Bu çalışma
gfp-R	5′ – ATTGGTACCTTATTTGTATAGTTCATCC – 3′	Bu çalışma
tsst-F	5′ –TCGAATTCATGAATAAAAAATTACTAATG – 3′	Bu çalışma
tsst-R	5′ –TCAAGCTTTTAATTAATTTCTGCTTC – 3′	Bu çalışma
m13F	5′ –GTAAAACGACGGCCAGT – 3′	Vieira et al.[1]
m13R	5′ –GAGCGGATAACAATTTCACACAGG – 3′	Vieira et al.[1]

alkol (25:24:1) ile saflaştırılıp birleştirildikten sonra T4 polinükleotid kinaz ile fosforilasyona maruz bırakılmıştır. Fosforilasyon reaksiyonu için 1 µl T4 polinükleotid kinaz (10 U), 2 µl 10X reaksiyon tamponu, 2 µl ATP (10 mM) ve 15 µl kütleştirilmiş amplikon DNA'sı kullanılmış ve 20 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Fosforlanmış ürünler fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) ile saflaştırılmıştır.

Kütleştirilmiş ve fosforlanmış amplikonların ligasyonu ve DH10B suşuna aktarılması: Saflaştırılmış küt ve fosforlu ürünlerin ligasyonunda 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U), 1 µl %50 PEG 4000 solüsyonu ve 16 µl DNA kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyon karışımı bir saat 22°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün Sambrook ve ark.nın[7] kimyasal transformasyon protokolüne göre kompetan hücre hazırlanmış ve protokole göre ligand



Şekil 2. Ampisilin direnç geni içermeyen plazmid omurgasının çoğaltılması ve primerlerin lokasyonları.

kompetan hücreye aktarılmıştır. Transformasyon sonrası plazmid aktarılmış bakterilerin seçimi için 10 µl/ml kloramfenikol içeren TSA besiyerine ekim yapılmış ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Transformantlarda plazmid kaynaklı kloramfenikol direncinin belirlenmesi: Seçici besiyerinde (10 µg/ml kloramfenikol içeren TSA) çoğalan transformantlara, genotipik doğrulama için spesifik primerlerle koloni PCR yapılmıştır. Pozitif sonuç veren kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmidler tek kesim yeri olan EcoRI enzimi ile kesilmiş ve boyutunu belirlemek amacıyla %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Tablo 2. Plazmid omurgası *cat, bla, gfp* ve *tsst* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.

PCR Döngüsü	Çoğaltılan fragman	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü
İlk denatürasyon	Plazmid omurgası, *cat, bla, gfp, tsst*	94	4	1
Denatürasyon	Plazmid omurgası	94	0.5	
	cat,	94	0.5	
	bla, gfp, tsst	94	0.5	
Bağlanma	Plazmid omurgası	50	0.5	35
	cat,	44	0.5	
	bla, gfp, tsst	50	0.5	
Uzama	Plazmid omurgası	72	2	
	cat,	72	0.5	
	bla, gfp, tsst	72	0.5	
Son uzama	Plazmid omurgası, *cat, bla, gfp, tsst*	72	6	1

Rekombinant plazmid pozitif suşların kloramfenikol direnç düzeyi mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Ampisilin direnç geninin *(bla)* pADU94'e klonlanması ve transformasyonu: Ampisilin direnci sağlayan *bla* geni spesifik primerlerle Tablo 2'de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Taq polimerazla çoğaltılan amplikon 3' ucundaki adenin nükleotidi T4 DNA polimeraz enzimi ile kesilerek kütleştirilmiştir. Bu amaçla 1 µl T4 DNA polimeraz (1U), 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı (8 mM) ve 14 µl amplikon kullanılmış ve 20 dakika boyunca 11°C'de inkübe edilmiştir. Kütleştirilen amplikonlar fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) ile saflaştırılmıştır.

pADU94 plazmidinin linearizasyonu için 10 µl plazmid, 2 µl 10X buffer, 1 µl smaI enzimi ve 7 µl steril su kullanılmıştır. Reaksiyon 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) ile saflaştırılmıştır.

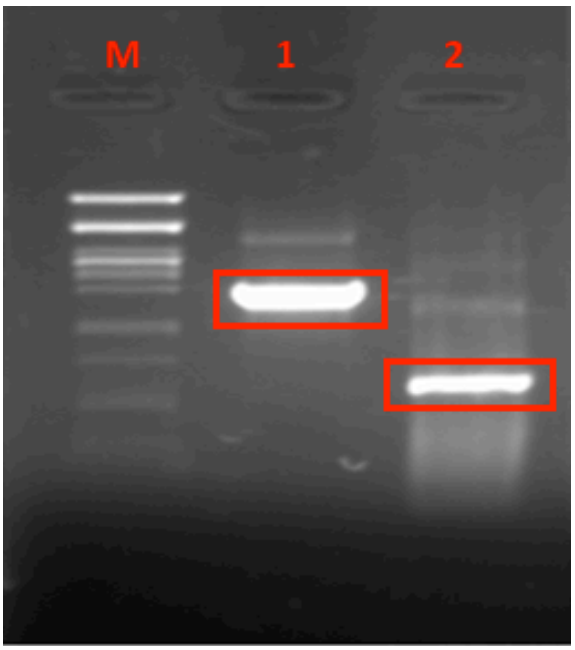
Lineer 7 µl pADU94 plazmidi, kütleştirilmiş 10 µl *bla* amplikonu, 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu ve 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U) kullanılarak ligasyon kurulmuştur ve gece boyunca 22°C'de inkübe edilmiştir. Sambrook ve ark.'nın[7] kimyasal transformasyon protokolüne göre pADU94Ω*bla* ligandı DH10B *E. coli* suşuna transforme edilmiştir ve 10 µg/ml kloramfenikol ve 100 µg/ml ampisilin içeren TSA seçici besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün çoğalan kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmış ve HindIII restriksiyon enzimi ile kesilerek 1%'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

pADU94Ω*bla* plazmidi içerdiği doğrulanan transformantların ampisilin direnç düzeyi mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Sonrasında bu transformantlarda *bla* geninin ekspresyonu sonucunda oluşan enzimin, beta laktam (penisilin) inaktivasyonunu gerçekleştirdiğini göstermek amacıyla modifiye Hodge testi yapılmıştır[8]. Bu testte indikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus*, pozitif kontrol olarak pUC19 plazmidi içeren *E. coli* DH10B, negatif kontrol olarak *E. coli* DH10B ve 10 µg penisilin içeren antibiyotik diski kullanılmıştır.

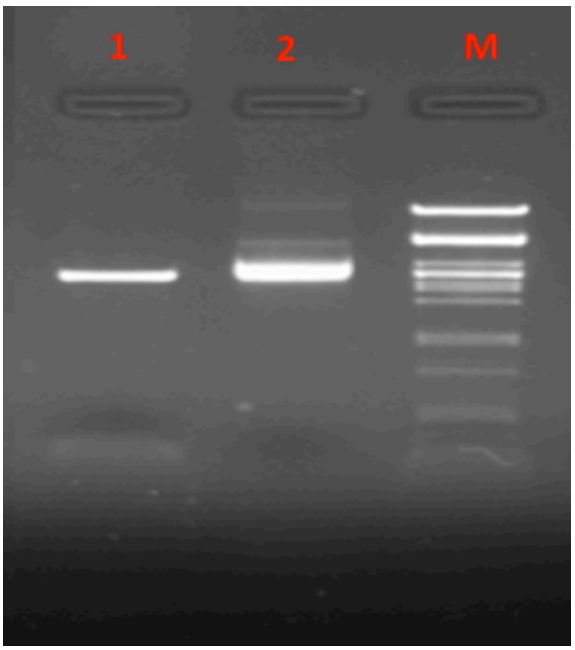
***gfp* (Yeşil Floresans Protein) ve *tsst* (Toksik Şok Sendrom Toksini)'nin pADU94'e klonlanması ve transformasyonu:** *gfp* genini çoğaltmak için bu çalışmada dizayn edilen restriksiyon enzim bölgeleriyle modifiye edilmiş spesifik primer çifti (Tablo 1) kullanılmış ve Tablo 2'te belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kurulmuştur. Amplikonların restriksiyonu için, 10 µl *gfp* amplikonu, 2 µl 10X buffer ve 1 µl BamHI, 1 µl KpnI enzimi ve 6 µl steril su kullanılmıştır. Klonlama vektörü pADU94 plazmidi de aynı koşullarda kesilmiş ve bu iki restriksiyon ürünü fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) saflaştırması sırasında birleştirilmiştir. Presipitasyondan sonra kesilmiş vektör ve inserti içeren pellet 17 µl distile suda resüspanse edilmiş ve 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U) eklenerek 22°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Bu çalışmada dizayn edilen ve restriksiyon enzim kesim yeri eklenerek modifiye edilen spesifik primerler (Tablo 1) kullanılarak *tsst* geni *S. aureus* ADUP5 suşundan Tablo 2'de belirtilen koşullarda PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan tsst amplikonu ve pADU94 vektörü 10 µl DNA, 2 µl 10X buffer, 1 µl HindIII, 1 µl EcoRI ve 6 µl steril su kullanılarak 37°C'da 1 saat inkübe edilerek kesilmiştir. Restriksiyon enzimleriyle kesilen bu iki ürün fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) saflaştırması sırasında birleştirilmiş ve presipitasyon sonrası 17 µl su ile resüspanse edilmiş, 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U) eklenerek 22°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Transformasyon: pADU94Ω*gfp* ve pADU94Ω*tsst* ligandları *E. coli* DH10B suşuna transforme edilmiştir ve final konsantrasyonu 10 µg/ml kloramfenikol, 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) ve 50 µg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil--D-galacktosidaz (X-gal) olan TSA besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kloramfenikollü besiyerinde büyüyen beyaz kolonilere m13F ve m13R primer çifti kullanılarak koloni PCR yapılmıştır.



Şekil 3. Plazmid omurgasının ve kloramfenikol direnç geninin PCR görüntüsü. 1 numarada ampisilin direnç geni dışlanmış pUC19 plazmidi amplikonu (1800 bp), 2 numarada kloramfenikol direnç geni amplikonu (626 bp) Kullanılan markır sağda gösterilmektedir. M. Lambda-PstI markır.



Şekil 4. pADU94 plazmidinin lineer ve sirküler formu. 1 numarada linearize edilmiş pADU94 plazmidi (2426 bp) ve 2 numarada plazmidin linearize edilmemiş hali gösterilmektedir. Kullanılan markır sağda gösterilmektedir. M. Lambda-PstI markır.

Beklenen boyutta bant görülen kolonilerden, plazmid izolasyonu yapılmış (Presto™ Mini Plasmid Kit) ve pADU94Ω*gfp* plazmidi BamHI-KpnI enzimleriyle, pADU94Ω*tsst* plazmidi HindIII-EcoRI enzimleriyle kesilmiştir. Buna ek olarak, pozitif sonuç veren pADU94Ω*gfp* plazmidi içeren hücre UV ışığı altında görüntülenmiştir.

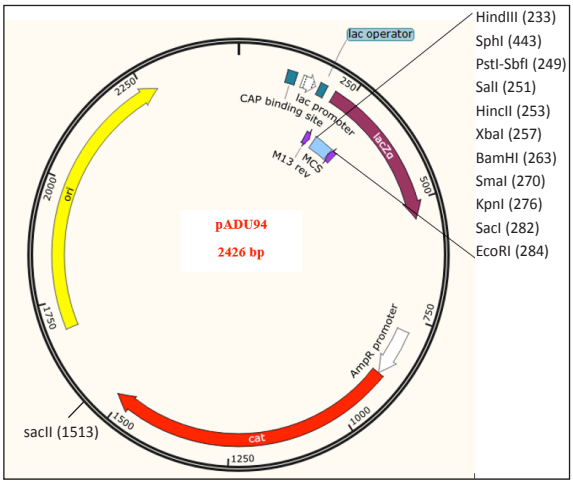
BULGULAR

pADU94 plazmidinin eldesi: Kloramfenikol direnç geni ve vektör omurgasının PCR ürünleri %1'lik jelde yürütülmüş ve jelde görüntülenmiştir. Kloramfenikol direnç geni 626 baz çiftlik (bç) ve vektör omurgasının 1800 baz çiftlik beklenen boyutta görüntülenmiştir (Şekil 3). Kloramfenikol direnç geni ve vektör omurgasının ligasyonundan elde edilen ürünün transformasyonu sonucunda 10 µg/ml kloramfenikollü besiyerinde çoğalan bakterilere *cat* spesifik primerleri ile koloni PCR yapılmış ve PCR ürünleri 1%'lik jelde yürütülmüştür. Yerleştirilen kloramfenikol direnç geninin varlığı doğrulanmıştır. Pozitif sonuç veren kolonilerden biri seçilerek plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu plazmid çoklu klonlama bölgesinde tek kesim yeri bulunan HindIII enzimi ile kesilmiş ve kesilmemiş hâlde %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 4'te HindIII enzimi ile kesilmiş pADU94 plazmidi 2426 baz çiftlik beklenen boyutta ve pADU94 plazmidi sirküler ve süpercoiled yapıda farklı konformasyonlarda görülmektedir. Şekil 5'te ise inşa edilen vektörün haritası görülmektedir.

Klonlanan *cat* geni içerisinde çoklu klonlama bölgesindeki restriksiyon enzim bölgeleri olmadığı için bu enzimler klonlama için elverişlidir (Şekil 5). Buna ek olarak, yerleştirilen kloramfenikol direnç geni sekansı sonunda SacII enzim kesim bölgesi bulunmaktadır.

pADU94 vektörünün bulunduğu transformantlarda kloramfenikol MİK değerinin 2 µg/ml'den 64 µg/ml'ye çıktığı saptanmıştır.

bla geninin pADU94 vektörüne klonlanması: %1'lik jelde *bla* amplikonu beklenen 816 bç'lik boyutlarda görüntülenmiştir. *bla* amplikonunun pADU94 vektörüne klonlanmasıyla elde edilen plazmidin boyutunu

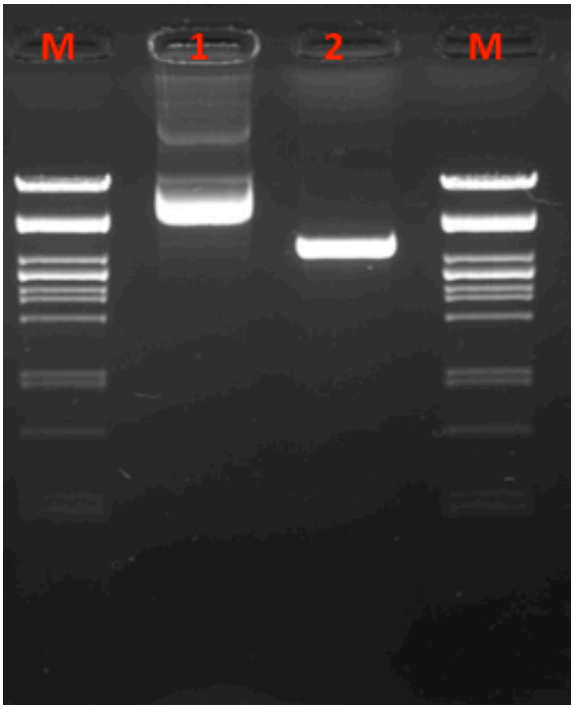


Şekil 5. pADU94 vektörünün haritası.

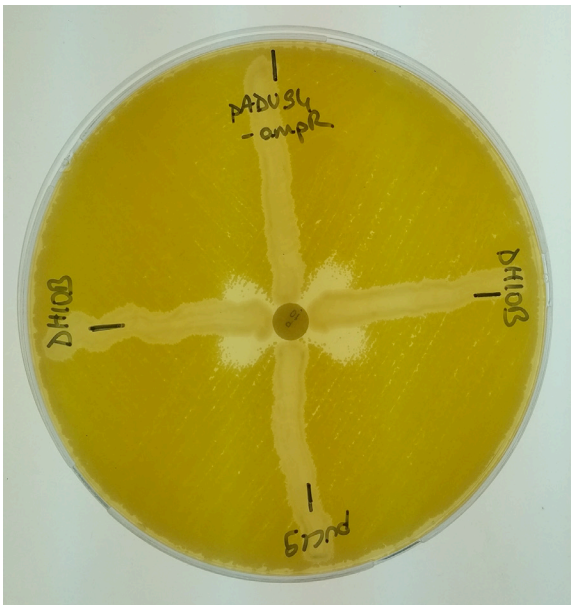
belirlemek amacıyla HindIII restriksiyon enzimi ile kesim gerçekleştirilmiştir ve vektörün lineer ve sirküler hâli 1%'lik jelde görüntülenmiştir (Şekil 6).

pADU94Ω*bla* vektörünün bulunduğu transformantlarda ampisilin MİK değerinin 8 µg/ml'den 64 µg/ml'ye çıktığı saptanmıştır. Modifiye Hodge testi sonucunda, negatif kontrol olarak kullanılan plazmid içermeyen DH10B çevresinde mikrokok büyümesi gözlenmemiş ve pozitif kontrol olarak kullanılan pUC19 plazmidi içeren DH10B çevresinde ise mikrokokların büyüdüğü gözlenmiştir. pADU94Ω*bla* plazmidi içerdiği doğrulanan transformantların çevresinde ise mikrokokların büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 7).

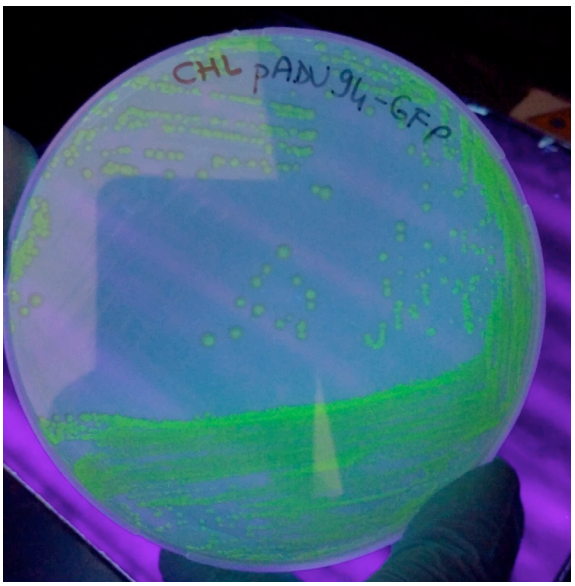
***gfp* (Yeşil Floresans Protein) ve *tsst* (Toksik Şok Sendrom Toksini)'nin klonlanması:** Çoğaltılan *gfp* geni pADU94 içerisine klonlanmış ve plazmidin insert aldığı seçici besiyerindeki beyaz kolonilere m13F ve m13R primer çifti ile koloni PCR ile 717 baz çiftlik *gfp* bantı çoğaltılarak gösterilmiştir. PCR'da pozitif sonuç veren kolonilerden birinden elde edilen plazmid BamHI ve KpnI enzimleri ile kesilmiş ve 1%'lik jelde yürütülmüştür. pADU94 2426 bç'lik boyutta ve *gfp* 717 bç'lik beklenen boyutlarda görüntülenmiştir (Şekil 8). pADU94Ω*gfp* plazmidini içeren hücreler, *gfp* ekspresyonunu gözlemlemek amacı ile UV ışınlarına maruz bırakılmış ve yeşil parlama gözlenmiştir (Şekil 8).



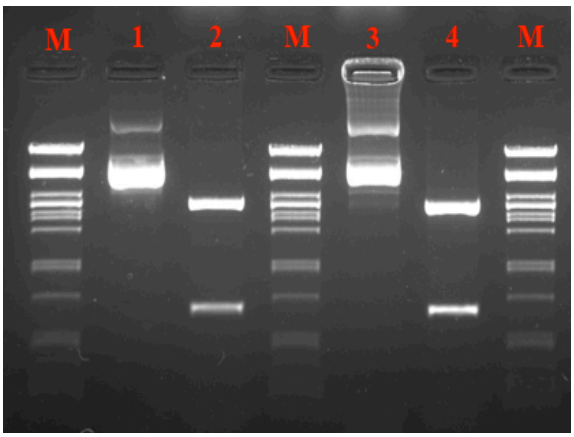
Şekil 6. pADU94Ω*bla* plazmidinin sirküler ve lineer formu. 1 numarada pADU94Ω*bla* plazmidinin linearize edilmemiş hâli ve 2 numarada pADU94Ω*bla* plazmidinin lineer hali beklenen 3242 bç'lik boyuttadır. M. Lambda-PstI markır.



Şekil 7. pADU94Ω*bla* plazmidi içeren transformantlara yapılan Modifiye Hodge testi sonucu görülen zonlar. A (pADU94Ω*bla*) ve C (pUC19) ile gösterilen suşlar inaktivasyon geni bla içermekte ve B ve D suşları içermemektedir. B-laktamaz geni içeren suşların inhibisyon zonu içinde kalan bölümlerinde *Micrococcus luteus* üremesi gözlenmektedir. pADU94Ω*bla* plazmidi içeren transformantlar: pADU94Ω*bla*, negatif kontrol: *Escherichia coli* DH10B, pozitif kontrol: pUC19 vektörü içeren *Escherichia coli* DH10B.



Şekil 8. pADU94Ω*gfp* plazmidini içeren transformantların UV ışığı altında yeşil parlama görüntüsü.



Şekil 9. pADU94Ω*gfp* ve pADU94Ω*tsst* plazmidlerinin kesilmemiş ve klonlamada kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesilmiş formları. 1 numarada kesilmemiş pADU94Ω*gfp* plazmidi, 2 numarada pADU94Ω*gfp* plazmidinin BamHI ve KpnI enzimleri ile kesilmiş formu, 3 numarada pADU94Ω*tsst* plazmidi, 4 numarada pADU94Ω*tsst* plazmidinin EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesilmiş formu 1%'lik jelde görüntülenmiştir. M. Lambda-PstI markır.

pADU94Ω*tsst* klonlamasında oluşan beyaz kolonilere m13F ve m13R primer çifti ile koloni PCR yapılmıştır ve beklenen 708 bç'lik boyutta bant gözlenmiştir. PCR'da pozitif sonuç veren kolonilerden birinden elde edilen plazmid, EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesilmiş ve 1%'lik jelde yürütülmüştür. pADU94 2426 bç'lik boyutta ve *tsst* 708 bç'lik beklenen boyutlarda görüntülenmiştir (Şekil 9).

TARTIŞMA

Rekombinant DNA çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamıştır. Rekombinant DNA'lar, biyoteknoloji ve biyomühendislik gibi alanlarda sıklıkla kullanılmakta ve farklı sektörlerde kullanılabilen ürünler elde edilmektedir. Bu rekombinant DNA'ların yapımı ve transferi için vektörler kullanılmaktadır[9]. Gereksinime göre vektörler manipüle edilmekte ve inşa edilmektedir[10]. Vektör kullanım alanlarından biri bilinmeyen direnç genlerinin karakterizasyon amaçlı klonlanması veya bilinen direnç genlerinin klonlanarak özelliklerinin araştırılmasıdır[11].

Günümüzde beta laktam direnç genleri, enfeksiyon ve çevre bakterilerinde yaygın olarak bulunmaktadır[12]. Bu genlerin klonlanması için markır olarak beta laktam direnç geni içermeyen vektörlere gereksinim duyulmaktadır. Beta laktam direnç geni içermeyen vektör için diğer bir gereklilik ise, özellikle ampisilin üretiminin son yıllarda azalması ve sağlanmasında zorluk yaşanmasıdır. Bu çalışmada, beta laktam dışı bir markır içeren vektör oluşturmak için dizayn edilen vektörün kloramfenikol direnç geni içermesi hedeflenmiş ve pADU94 vektörü oluşturulmuştur.

Yüksek kopya sayılı olması ve mavi beyaz görüntülemeye olanak vermesi nedeniyle pUC türevli vektörler sıklıkla gen klonlanmasında kullanılmaktadır. Buna ek olarak, küçük boyutlu yapısıyla transformasyon başarısını artırması nedeniyle tercih nedenidir. Bu vektörlerden biri olan pUC19 vektörü ise antibiyotik direnç genlerinin klonlanmasında kullanılmaktadır fakat beta laktam direnç genlerinin klonlanması bu vektör ile gerçekleştirilememektedir. Bu çalışmada dizayn edilen vektöre beta laktam direnç geninin yerine kloramfenikol direnç geni yerleştirilmiştir. pUC19 vektörü sinyal peptidine sahip olan beta laktam direnç geni içermesi nedeniyle hücre dışına salgılanmakta ve koloni çevresinde satellite oluşumuna neden olmaktatır. Bu da kontaminasyon riskini arttırmaktadır[2]. Kloramfenikol asetil transferaz ise etkinliğini hücre içinde gösterdiği için satellite koloni-

lerin üremesine olanak vermemektedir[13].

Konstrüksiyon metodu ise, geleneksel restriksiyon yöntemleriyle vektör dizaynından farklıdır. Oluşturulacak vektör omurgası PCR yoluyla elde edilmiştir. Kloramfenikol direnç geninin yerleştirileceği bölgenin ribozomal bağlanma bölgesi ve promotör sekansı içermesi dikkate alınmış ve çalışmada kullanılacak primerler ona göre olarak dizayn edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ve ayrıntılı olarak anlatılan vektör markırı değiştirme yöntemi laboratuvarların gereksinimlerine göre vektör oluşturabilmelerine olanak veren, moleküler bölümü olan her laboratuvarda rahatlıkla kullanılabilecek bir yöntemdir.

pADU94 vektörünün mavi beyaz seçilimde etkin olduğunu ispatlamak amacıyla *tsst* klonlaması yapılmış ve elde edilen beyaz kolonilerin pADU94Ω*tsst* olduğu plazmid izolasyonu ile doğrulanmıştır. Aynı zamanda, ekspresyon varlığını ortaya koymak amacı ile vektöre *gfp* geni klonlanmıştır. Plazmid izolasyonu ile pozitif sonuç veren örneklerin UV ışık altında parlama yapmasıyla pADU94'ün ekspresyon çalışmalarında da kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmanın sonucu, beta laktam direnç genlerinin klonlanması için vektör konstrüksiyonudur. pUC19'da bulunan beta laktam direnç geni pADU94 vektörüne klonlanmış ve transformantlara modifiye Hodge testi ile uygulanmıştır. Bu testte, *bla* geninin ekspresyonu sonucu salgılanan beta laktamaz enzimlerinin penisilini parçaladığı, bu sayede penisiline hassas *M. luteus* bakterilerinin penisilin inhibisyon zonu içerisinde bulunan transformantlar yakınında büyüyebildiği tespit edilmiştir. Böylece, beta laktam direnç geninin pADU94 içine klonlanmasıyla inşa edilen vektörün amacına ulaştığı gösterilmiştir.

Oluşturulan vektöre, beta-laktam direnç geni *(bla)* klonlanmıştır ve pADU94 vektörünün beta-laktam direnç genlerinin klonlanması için uygun bir aday olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, bir vektörün markırının gereksinime göre, kolay bir yöntemle değiştirilebileceği bu çalışma ile gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Vieira J, and Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. 1982;19:259-68. https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90015-4
2. Manna S, Harman A, Accari J, Barth C. Altering the selection capabilities of common cloning vectors via restriction enzyme mediated gene disruption. BMC Res Notes. 2013;6:85. https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-85
3. Preston A. Choosing a cloning vector. Methods Mol Biol. 2003;235:19-26. https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:19
4. Hann FE, Wisseman CL Jr, Hopps HE. Mode of action of chloramphenicol. III. Action of chloramphenicol on bacterial energy metabolism. J Bacteriol. 1955;69(2):215-23. https://doi.org/10.1128/JB.69.2.215-223.1955
5. Shaw WV, Packman LC, Burleigh BD, Dell A, Morris HR, Hartley BS. Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. Nature. 1979;282(5741):870-2 https://doi.org/10.1038/282870a0
6. Podbielski A, Peterson JA, Cleary P. Surface protein-*CAT* reporter fusions demonstrate differential gene expression in the vir regulon of *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol. 1992;6(16):2253-65. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01401.x
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vols. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA; 1989.
8. Amjad A, Mirza IA, Abbasi SA, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. Iran J Microbiol. 2011;3(4):189-93.
9. Khan S, Ullah MW, Siddique R, et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. Int J Genomics. 2016;2016:2405954. https://doi.org/10.1155/2016/2405954
10. Bolivar F, Backman K. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. Methods Enzymol. 1979;68:245-67. https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)68018-7
11. Murakami T, Nojiri C, Toyama H, et al. Cloning of antibiotic-resistance genes in *Streptomyces*. J Antibiot (Tokyo). 1983;36(10):1305-11. https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.1305
12. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J Biol Sci. 2015;22(1):90-101. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002
13. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev. 2004;28(5):519-42. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):35-43
doi:10.5222/TMCD.2020.035

Araştırma / *Research Article*

İÜ-C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda, 2013-2018 Yılları Arasında *Toxoplasma gondii,* Rubella ve Sitomegalovirus Seropozitifliği ile Avidite Test Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi

Retrospective Evaluation of Toxoplasma gondii, Rubella and Cytomegalovirus Seropositivity and Avidity Test Results in Patients Admitted to İU-C Cerrahpaşa Medical Faculty Hospital Between 2013-2018

Esra Demir*, Harika Öykü Dinç, Doğukan Özbey*, Seher Akkuş*, Sevgi Ergin***
Bekir Sami Kocazeybek*

*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
**İstanbul Okan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji/ELISA Laboratuvarı'na Ocak 2013-Aralık 2018 yılları arasında çeşitli klinik endikasyonlar nedeniyle gönderilen Toxoplasma gondii, rubella ve Cytomegalovirus (CMV) enfeksiyonu şüpheli yada gebelik izlemiyle ilgili rutin kontrol amaçlı olguların serum örneklerinde IgM ve IgG antikor seropozitifliği ile IgG avidite test sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlandı.*
Yöntem: *2013-2018 yılları arasında İÜ-C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran 84.807 hastaya ait serum örneklerinde immun capture ELISA yöntemi ile çalışılmış T. gondii, rubella ve CMV IgM antikorları ve indirekt ELISA yöntemiyle saptanan T. gondii, rubella ve CMV IgG antikorları değerlendirildi. Ayrıca indirekt ELISA yöntemi ile T. gondii, rubella ve CMV IgG avidite test incelemesi yapılan 916 olgunun IgG avidite test sonuçları irdelendi.*
Bulgular: *Çalışmamızda, T. gondii, rubella ve CMV için IgM/IgG pozitifliği sırasıyla %2.2/%97.8, %0.24/%99.7 ve %3.1/%94 olarak saptanmıştır. IgM ve IgG pozitif olan, her üç etkene dönük avidite indeks testi istenen olgu sayısı 274 (%30) olup, T. gondii, rubella ve CMV için düşük avidite indeksi saptanma oranı sırasıyla, 44 (%16), 9 (%3.2) ve 8 (%2.9)'dir.*
Sonuç: *Çoklu moleküler testler yetişkinlerde görülen solunum yolu enfeksiyonlarında viral etkenlerin rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu enfeksiyonlarda etkene yönelik tanıyla viral ajanın tespitinin, doğru tedavi uygulaması ile antibiyotiklerin gereksiz kullanımını engellemekte yararlı olacağı ve enfeksiyon kontrol önlemleri için hızlı ve doğru yönetim kararlarının alınmasını sağlayacağını düşünmekteyiz.*

Anahtar kelimeler: *Toksoplazmoz, sitomegalovirus enfeksiyonu, rubella, IgG avidite*

ABSTRACT

Objective: *The aim of this study was to evaluate retrospectively results of the IgM and IgG antibody seropositivity and IgG avidity tests performed in serum samples obtained from patients with suspected Toxoplasma gondii, rubella and Cytomegalovirus (CMV) infections or for routine control for pregnancy follow up which were sent to Medical Microbiology Serology/ELISA Laboratory of Cerrahpaşa Faculty of Medicine between January 2013 and December 2018 with various clinical indications.*
Method: *T. gondii, rubella and CMV IgM antibodies examined by immunocapture ELISA method and T. gondii, rubella and CMV IgG antibodies detected by indirect ELISA method in serum samples of 84,807 patients who applied to Laboratories of Istanbul University Cerrahpaşa Faculty of Medicine Hospital between 2013-2018 were evaluated. In addition, IgG avidity test results were examined in serum samples of T. gondii, rubella and CMV IgG avidity tests were performed using indirect ELISA tests realized in 916 cases.*
Results: *In the study, IgM / IgG positivities for T. gondii, rubella and CMV were found to be 2.2% / 97.8%, 0.24% / 99.7% and 3.1%/ 94%, respectively. Avidity index tests for all three agents were requested for 274 (30%) cases with both IgM and IgG- positivities The detection rate of low avidity indices for T. gondii, rubella and CMV were 44 (16%), 9 (3.2%) and 8 (2.9%) respectively.*
Conclusion: *Multiple molecular tests provide a better understanding of the role of viral agents in respiratory infections in adults. We think that the detection of the viral agent with the diagnosis of the agent targeted in these infections will be beneficial in preventing unnecessary use of antibiotics with the correct treatment application and will provide fast and accurate management decisions for infection control measures.*

Keywords: *Toxoplasmosis, cytomegalovirus infections, rubella, IgG avidity*

Alındığı tarih / Received:
21.06.2019 / 26.June.2019
Kabul tarihi / Accepted:
24.10.2019 / 24.October.2019
Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

E. Demir 0000-0002-7479-2974
H. Ö. Dinç 0000-0003-3628-7392
D. Özbey 0000-0002-0596-1551
S. Akkuş 0000-0002-9236-2062
S. Ergin 0000-0003-2039-3078
B. S. Kocazeybek 0000-0003-1072-3846

✉ bakir.esr@gmail.com

Atıf: Demir E, Dinç HÖ, Özbey D, Akkuş S, Ergin S, Kocazeybek BS. İÜ-C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran hastalarda 2013-2018 yılları arasında *Toxoplasma gondii, Rubella* ve Sitomegalovirus seropozitifliği ile avidite test sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):35-43.

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Toxoplasma gondii, rubella ve Cytomegalovirus (TORC) tüm yaş gruplarında görülebilen toplum sağlığı açısından ciddi morbidite ve mortalite nedenleri arasında gösterilen enfeksiyon etkenleridir. Hamileliğin ilk trimesterlerinde annede yalnızca asemptomatik veya hafif bir enfeksiyona neden olurken fetüste çok daha ciddi etkiler görülebilmektedir. *Toxoplasma gondii,* rubella ve Cytomegalovirus (CMV) hamilelerde gebeliğin farklı trimesterlerinde konjenital enfeksiyonlar ile ilişkilendirilen, perinatal morbidite ve mortalitenin nedenleri arasında gösterilen enfeksiyöz etkenlerdir[1,2].

Toxoplasma gondii, hücre içi yerleşim gösteren ve fırsatçı patojen olarak tanımlanan ve tüm dünyada yaygın görülen bir parazittir. İnsanlara, enfekte etlerin yeterince pişirilmeden ya da çiğ yenilmesi, enfekte etle temas, kedi dışkısı ile etrafa yayılmış ookistlerin kontamine ettiği su ve toprakla temas, iyi yıkanmamış meyve ve sebzelerin tüketilmesi ile bulaşmaktadır[3]. Gebelikte immün yetmezlik ve akut enfeksiyon görülmesi durumunda konjenital yolla enfekte anneden fetüse de geçebilmekte ve fetus üzerinde hidrosefali, mikrosefali, serebral kalsifikasyon, sarılık, korioretinit, mikroftalmi, hepatosplenomegali ve hatta fetal ölüm gibi ciddi etkileri olabilmektedir. Toksoplasmoz sağlıklı bireylerde genellikle asemptomatik veya hafif bir klinik tablo ile seyrederken, immün sistemi baskılanmış kişilerde daha ciddi sonuçlar doğurmaktadır[4]. Rubella virüsü, genellikle çocukluk çağında ekzantematöz hastalık şeklinde ortaya çıkan bir enfeksiyöz etkendir. Halk sağlığı açısından önemi gebe kadınlarda neden olduğu "konjenital rubella sendromu"dur. Özellikle gebeliğin ilk trimesterindeki enfeksiyonlar; düşük, erken doğum, ölü doğum, hepatomegali, sarılık, katarakt, işitme kaybı, mikrosefali ve birkaç doğumsal kalp defekti içeren teratojenik etkilerle ilişkilendirilmektedir[5]. CMV seroprevalansı farklı popülasyonlarda ve ülkelerde değişkenlik gösteren, tüm dünyada endemik olan bir virüstür. CMV enfeksiyonu yetişkinlerde genellikle asemptomatiktir, fakat ender olarak immünsüprese kişilerde ve konjenital enfeksiyon şeklinde yenidoğanlarda görülmesi önemini arttırmaktadır. Özellikle konjenital enfeksiyon sonucu zekâ geriliği, koriyoretinit veya serebral kalsifikasyonlara neden olabilir[6].

Toxoplasma gondii, rubella ve CMV'nin serolojik tanısı özgül IgM ve IgG antikorlarının saptanmasına dayanmaktadır. IgG avidite testi multivalan bir antikor molekülünün multivalan bir antijenle bağlanma kuvvetine dayanmaktadır. IgG antikorlarının aviditesi ELISA veya immünfloresan (IF) yöntemi ile ölçülmektedir. Antijenle ilk karşılaşma olan primer enfeksiyonda etkene karşı oluşan IgG antikorları ilk oluştuklarında düşük avidite (≤40) gösterirken, daha sonra olgunlaşarak yüksek avidite (≥60) kazanırlar. Özellikle gebe kadınlarda *T. gondii,* rubella ve CMV primer enfeksiyonlarının reaktivasyon ve reenfeksiyonlarında, immünsupresif hastalarda ise primer ve rekürren enfeksiyonlardan sonra IgM'nin serumda uzun süre saptanmasının ayırıcı tanı zorluklarına yol açması nedeniyle IgG avidite testi önemli ve yol göstericidir[2,7,8]. Bu çalışmada, İstanbul merkezli, Marmara ve diğer coğrafik bölgelerden birçok hastanın başvuruda bulunduğu Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'ne ait 6 yıllık (Ocak 2013-Aralık 2018) serolojik verilerin retrospektif irdelemesi ile *T. gondii,* rubella ve CMV'ye ait serokonversiyonun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda her üç etkene spesifik IgG avidite testinin akut enfeksiyonların saptanmasındaki önemi ile birlikte test istemlerinin klinik laboratuvar işbirliği açısından amaca uygunluğunun algoritmik yerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ocak 2013-Aralık 2018 tarihleri arasında 6 yıllık dönemde dönemde İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran 88861 olguya ait serum örneklerinde immuncapture ELISA yöntemiyle belirlenen *T. gondii,* rubella ve CMV IgM antikor sonuçları ile indirekt ELISA yöntemiyle belirlenen *T. gondii,* rubella ve CMV IgG antikor sonuçları

incelendi. Altı yıllık dönemde aynı ticari marka kitler kullanılmıştır. *T. gondii* IgM/IgG antikor test istemi ile başvuranların 9.148 (%38.5)'i çocuk (18 yaş altı), 14.583 (%61.5)'i yetişkin idi. Rubella IgM/IgG antikor test istemi ile başvuranların 7.785 (%25.3)'i çocuk (18 yaş altı), 22.977 (%74.7)'si yetişkin idi. CMV IgM/IgG antikor test istemi ile başvuranların 10.131 (%29.4)'i çocuk (18 yaş altı), 24.237 (%70.6)'si yetişkin idi. Ayrıca 916 olguda istenen *T. gondii,* rubella ve CMV IgG avidite testi sonuçları da retrospektif olarak değerlendirildi. IgG avidite test istemi yapılan olguların 436 (%47.6)'sı ağırlıklı olarak çocuk hastalıkları kliniği (çocuk acil, çocuk hastalıkları enfeksiyon, yenidoğan), enfeksiyon hastalıkları kliniği, genel cerrahi transplantasyon servisi, iç hastalıkları (hematoloji, romatoloji, kemik iliği, nefroloji) servisine, 480 (%52.4)'i ise kadın doğum ve ilişkili (gebe polikliniği, perinatoloji ve tüp bebek) kliniklere aitti.

IgM antikorlarının araştırılmasında, Vircell ELISA IgM Capture testi (Vircell Microbiologists, İspanya) ticari kiti üreticinin önerileri doğrultusunda kullanıldı. Kit içeriğine göre <9 antikor titresi negatif, 9-11 arası antikor titresi ara değer ve >11 antikor titresi pozitif olarak kabul edildi. IgG antikorlarının araştırılmasında, Vircell ELISA IgG indirekt enzimimmunassay testi (Vircell Microbiologists, İspanya) ticari kiti kullanıldı. Üreticinin kit yönergesine göre <9 antikor titresi negatif, 9-11 arası antikor titresi ara değer ve >11 antikor titresi pozitif olarak kabul edildi. *T. gondii,* rubella ve CMV IgG aviditeyi saptamaya yönelik ticari ELISA kiti (DIA, PRO, İtalya) yine üreticinin önerileri doğrultusunda kullanıldı. IgG avidite indeksi <40 düşük avidite, 40-60 arası ara değer, >60 yüksek avidite olarak değerlendirildi. Verilerin yüzde oranları ile değerlendirildi.

BULGULAR

Toxoplasma gondii IgM/IgG antikor test isteği ile başvuran 23.731 olgunun 19.884 (%83.8)'ü kadın, 3.847 (%16.2)'si erkekti. Kadınların yaşları 0-84 (min-maks.) arasında olup, yaş ortalaması 27.4 ve erkeklerin yaşları 0-83 (min-maks.) olup, yaş ortalaması ise 23.2 idi. IgM antikoru çalışılan 12.100 olgunun 262 (%2.2)'sinde IgM antikoru pozitif olarak saptanmış olup, bu olguların 233 (%89)'ü kadın, 29 (%11)'u erkekti. *T. gondii* IgG antikoru çalışılan 11.631 olgunun 3787 (%325)'si pozitif olup 3.041 (%80)'i kadın, 746 (%20)'sı erkekti. Rubella IgM/IgG antikor test isteği ile başvuran 30.762 olgunun 23.261 (%75)'i kadın, 7.501 (%25)'i erkekti. Kadınların yaşları 0-84 (min-maks.) arasında olup, yaş ortalaması 20.2 erkeklerin yaşları 0-76 (min-maks.) arasında olup, yaş ortalaması 19.5 idi. Rubella IgM antikoru çalışılan 13.796 olguda rubella IgM antikor pozitifliği 34 (%0.2) örnekte saptanmış olup, bu örneklerin 10 (%29.5)'u kadın, 24 (%70.5)'ü erkekti. Rubella IgG antikoru çalışılan 16.966 olguda rubella IgG antikor pozitifliği 15.604 (%92) örnekte bulunmuş olup, 11.469 (%73.5)'u kadın, 4.135 (%26.5)'i erkekti. CMV IgM/IgG antikor test istekleri incelendiğinde 34.368 olgunun 24.185 (%70)'i kadın 10.183 (%30)'ü erkekti. Kadınların yaşları 0-83 (min-maks.) arasında olup, yaş ortalaması 27.8 ve erkeklerin yaşları 0-84 (min-maks.) arasında olup, yaş ortalaması ise 21.15 idi. Kadın CMV IgM antikoru çalışılan 17.076 olguda IgM antikor pozitifliği 541 (%3.2) örnekte saptanmış olup, olguların 265 (%49)'i kadın, 276 (%51)'sı erkekti. CMV IgG antikoru çalışılan 17.292 olguda IgG antikor pozitifliği ise 16.260 (%94) olguda saptanmış olup, 11.376 (%70)'sı kadın, 4.884 (%30)'ü erkekti (Tablo 1).

Her üç etkene dönük IgG avidite test istemi yapılan 916 olgunun 243 (%26.5)'ü *T. gondii* için, 338 (%36.9)'i rubella için ve 335 (%36.6)'i CMV için idi. IgG avidite test istemi yapılan olguların 436 (%47.6)'sı ağırlıklı olarak çocuk hastalıkları kliniği (çocuk acil, çocuk hastalıkları enfeksiyon, yenidoğan), enfeksiyon hastalıkları kliniği, genel cerrahi transplantasyon servisi, iç hastalıkları (hematoloji, romatoloji, kemik iliği, nefroloji) servisine, 480 (%52.4)'i ise kadın doğum ve ilişkili (gebe polikliniği, perinatoloji ve tüp bebek) kliniklere aitti.

Çalışmamızda, IgG avidite indeks testinin bilimsel olarak laboratuvar tanısal algoritmasına uygun olarak istenmesine temel olan serolojik patern IgM ve IgG

Tablo 1. *Toxoplasma gondii,* Rubella ve CMV seroprevalas oranlarının cinsiyete göre dağılımı.

	Toxoplasma gondii IgM		*Toxoplasma gondii* IgG		Rubella IgM		Rubella IgG		CMV IgM		CMV IgG	
Cinsiyet	**Negatif n (%)**	**Pozitif n (%)**	**Negatif n (%)**	**Pozitif n (%)**	**Negatif n (%)**	**Pozitif n (%)**	**Negatif n (%)**	**Pozitif n (%)**	**Negatif n (%)**	**Pozitif n (%)**	**Negatif n (%)**	**Pozitif n (%)**
Kadın	10111 (%83.5)	233 (%2)	6499 (%55.9)	6499 (%55.9)	11023 (%79.9)	10 (%0.07)	759 (%4.5)	11469 (%67.6)	12018 (%70.4)	265 (%1.6)	526 (%3.04)	11376 (%65.8)
Erkek	1727 (%14.3)	29 (%0.2)	1345 (%11.6)	1345 (%11.6)	2739 (%19.9)	24 (%0.17)	603 (%3.5)	4135 (%24.4)	4517 (%26.4)	276 (%1.6)	506 (%2.9)	4884 (%28.2)
Toplam	11838 (%97.8)	262 (%2.2)	7844 (%67.5)	7844 (%67.5)	13762 (%99.8)	34 (%0.2)	1362 (%8)	15.604 (%92)	16535 (%96.8)	541 (%3.2)	1032 (%6)	16260 (%94)

Tablo 2. Etkenlerin serolojik paternlerine göre avidite indeks düzeylerinin dağılımı.

	Toxoplasma gondii		Rubella		CMV	
Avidite İndeksi	**IgM(-)/IgG(+) n (%)**	**IgM(+)/IgG(+) n (%)**	**IgM(-)/IgG(+) n (%)**	**IgM(+)/IgG(+) n (%)**	**IgM(-)/IgG(+) n (%)**	**IgM(+)/IgG(+) n (%)**
Düşük Avidite	8 (%3.3)	44 (%18.1)	10 (% 3)	9 (%2.6)	17 (%5.08)	8 (%2.4)
Ara Değer	8 (%3.3)	15 (%6.2)	2 (% 0.6)	9 (%2.6)	7 (%2.08)	5 (%1.5)
Yüksek Avidite	62 (%25.5)	106 (%43.6)	292 (% 86.4)	16 (%4.7)	236 (%70.4)	62 (%18.5)
Toplam	78 (%32)	165 (%68)	304 (%90)	34 (%10)	260 (%77.6)	75 (%22.4)

pozitifliği olup, her üç etkene dönük avidite indeks testi istenen olgu sayısı 274 (%30)'tür. IgM ve IgG pozitif her üç etkene dönük avidite indeks testi istenen olguların dağılımı *T. gondii,* rubella ve CMV için sırasıyla, 165 (%60.2), 34 (%12.4) ve 75 (%27.4)'tir. Bunun dışında çalışmamızda, her üç etkenle ilgili olarak IgG avidite indeks testi istenen ve serolojik paterni IgM negatif IgG pozitif olan olgu sayısı ise 642 (%70)'dir. IgM negatif IgG pozitif olan her üç etkene dönük avidite indeks testi istenen olguların dağılımı *T. gondii,* rubella ve CMV için sırasıyla, 78 (%12), 304 (%47.5) ve 260 (%40.5)'tır (Tablo 2).

Toxoplasma gondii, rubella ve CMV IgG avidite testi çalışılmış, serolojik paterni IgM pozitif IgG pozitif olan düşük avidite indeksine sahip olguların dağılımı *T. gondii,* rubella ve CMV için sırasıyla, 44 (%16), dokuz (%3.2) ve sekiz (%2.9)'dir. Serolojik paterni IgM negatif IgG pozitif olup, düşük avidite indeks düzeyi saptanan olguların dağılımı ise *T. gondii,* rubella ve CMV için sırasıyla, sekiz (%1.2), 10 (%1.5) ve 17 (%2.7) olarak belirlendi.

Düşük avidite indeks düzeyi saptanan olguların her üç etkenle ilgili cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde *T. gondii* için 52 (%54) olgunun 47 (%90.4)'sinin kadın, beşinin (%9.6) erkek, rubella için 19 (%20) olgunun 11 (%57.9)'i kadın, sekizi (%42.1) ve CMV için 25 (%26) olgunun 16 (%64)'sı kadın, 9 (%36)'u erkekti. Her üç etkene dönük tipik ve atipik paterndeki ara değer ve yüksek avidite sonuçları Tablo 2'de gösterilmektedir.

TARTIŞMA

Toxoplasma gondii, rubella ve CMV öncelikle gebe, yenidoğan, immünsüprese ve transplantlı kişilerde önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar sonucunda ortaya çıkan etkilerin önlemesi amacıyla serolojik tarama testleri önem taşımaktadır. Özellikle gebelik döneminde geçirilen enfeksiyonlar düşük, ölü doğum, prematürite, intrauterin büyüme geriliği ve konjenital malformasyonlar ile doğumda veya hemen sonrasında görülen akut hastalık tablosu ile sonuçlanabilmektedir[9,10].

Konjenital enfeksiyonlar açısından risk taşıyanlar toplumda doğurganlık çağındaki seronegatif kadınlardır. TORCH taramasının gerekli olup olmadığına karar verebilmek için o toplumda seronegatiflik oranlarının bilinmesi gerekir. Ülkemizde pek çok bölgede özellikle doğurganlık çağındaki kadınlarda, gebelerde ve farklı yaş gruplarında, değişik sosyoekonomik koşullara sahip bireylerde *T. gondii,* rubella ve CMV için yapılmış seroprevalans çalışmaları ile seropozitiflik oranları bildirilmiştir[11,12].

Toxoplasma gondii seroprevalansının tüm dünyada dağılımı incelendiğinde, global seropozitiflik oranları ve hastalık dağılımı çeşitli risk faktörleri ile ilişkilendirilmekte olup, bu risk faktörleri; iklim yapısı, kedi ve diğer evcil hayvan türlerinin yaygınlığı ve beslenme davranışlarını (çiğ et tüketimi, kontamine içme suyu ve çiğ sebzelerin tüketimi) içermektedir. Seropozitiflik oranları Pakistan'da %47 ve komşumuz İran'da %39 oranlarında bulunmuştur[13,14]. Ülkemizde geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda, *T. gondii* seropozitiflik oranları, bölgelere, yaşam tarzındaki farklılıklara ve çalışılan olgu gruplarına göre değişkenlik göstermektedir. Seropozitifliğin yüksek olduğu bölgeler, özellikle doğu ve güneydoğu bölgeleri, kırsal kesimde yaşayıp tarımla uğraşın ve çiğ et tüketim alışkanlığının fazla görüldüğü bölgelerdir. Doğu ve güneydoğuda yapılmış çalışmalardan Urfa'da %69.5 ve %60; Malatya'da %72.7 oranlarında *T. gondii* IgG seropozitiflik oranları saptanmıştır[15-17]. Buna karşın İstanbul, Ankara ve Edirne'de yapılmış çalışmalarda bildirilen seropozitiflik oranları sırasıyla, İstanbul'dan %31.4 ve %26, Ankara'dan %37 ve Edirne'den %31.9'dur[18-21].

Biz de çalışmamızda, *T. gondii* IgM antikor seropozitifliğini %2.2, IgG antikor seropozitifliğini ise %32.5 olarak saptadık. İncelenen örnekler tüm yaş gruplarında toksoplazmozis şüphesi ile çeşitli kliniklere başvuru yapmış bireylere aitti. Çalışmamızda elde ettiğimiz seropozitiflik oranları İstanbul, Edirne ve Tokat ilinde yapılmış çalışmalar ile uyum göstermekte olup, diğer çalışmalarla bölgesel farklılıklar nedeniyle uyum göstermemektedir. Kentsel bir bölgede yer alan ve kozmopolit bir şehir olan İstanbul ilinde yapılmış olan bu çalışmada elde edilen veriler her üç kişiden birinde *T. gondii* enfeksiyonu geçirildiğini göstermiştir. Seropozitifliğin ülkemizin kırsal bölgelerinde yüksek oranlarda, kentsel alanlarda da birbiriyle uyumlu oranlarda olması, koruyucu halk sağlığı çalışmaları bakımından, seronegatif bireylerin belirlenmesinde tarama testlerinin önemini göstermektedir. Seropozitif olarak saptanan 3.787 (%32.5) olgunun 3.041 (%80)'inin kadın olduğu göz önüne alındığında, özellikle gebelerde *T. gondii* enfeksiyonlarından korunmak için bilgilendirme çalışmalarının gerekliliğini göstermektedir[20,22].

CMV seropozitiflik oranları ülkelere göre değişkenlik göstermektedir. Komşumuz İran'da %98.8, Irak'ta %100, İtalya'da %65 ve Almanya %40.3'tür[23-26]. Ülkemizde yapılan CMV çalışmalarında CMV IgG antikor seropozitiflik oranları %80-99 arasında bildirilmiştir[25,26]. İstanbul'da yapılan bir çalışmada, CMV IgG antikor seropozitifliği %99.3 oranında bulunmuştur[19]. Çalışmamızda, CMV IgM seropozitifliğini %3.2 oranında, IgG seropozitifliğini %94 oranında saptadık. Çalışma verilerimiz İstanbul ve İran verileri ile uyum göstermektedir.

Dünyada rubella seropozitifliğine bakıldığında, komşumuz İran'da %96, Yunanistan'da %86.1, İtalya'da %92, İngiltere'de 93.7 ve İspanya'da 94.1 oranlarında bildirilmiştir[29]. 2019 yılında yayınlanan bir meta analiz çalışmasında, ülkemizdeki rubella IgM antikor seropozitifliği %0.78, IgG antikor seropozitifliği ise %93.4 olarak bulunmuştur[30]. İzmir'de yapılan çalışmada ise %95.9 seropozitivite saptanmıştır[31]. Çalışmamızda, hastanemize rubella taraması amacıyla başvuran tüm olgular incelenmiş olup, rubella IgM antikor seropozitiflik oranı %0.2 ve IgG antikor seropozitiflik oranı ise %92 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz veriler İngiltere, İtalya ve İspanya verileri ile benzerlik göstermektedir. IgM ve IgG antikor seropozitiflik oranlarımız ülkemizden bildirilen çeşitli çalışmalar ve meta analiz çalışma sonuçları ile yakınlık göstermektedir[30]. Ülkemizde rubella aşılama programı 2006 yılı itibariyle

uygulanmaya başlanmıştır. Ancak 18 yaş üstü bireylerde aşılama yapılmamak-tadır. Yüksek seropozitiflik oranları aşılamanın yanı sıra toplumda geçirilmiş rubella enfeksiyonları ile ilişkilidir. Seronegatif genç kadınların tespit edilmesi, gebelik öncesi aşılamanın yapılması koruyucu sağlık hizmetleri açısından önemli görülmektedir. Çalışmamızda, rubella IgM antikor pozitifliği 34 (%0.24) örnekte saptanmış olup, bu örneklerin 10 (%29)'u kadın, 24 (%71)'ü erkekti. Yüksek IgM seropozitiflik oranının görüldüğü 24 erkek olgunun retrospektif incelememizde 19'unun 0-1 yaş arası olgular olduğu ve saptanan bu pozitifliklerin annenin akut rubelloz klinik durumu ile ilintili olduğunu, yaşları 3-37 arasında (ortalama 11.2) diğer 5 olgunun ise daha önce geçirilmiş rubella öyküsü ile ilgili uzamış serokonversiyon görülmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Her ne kadar retrospektif çalışmamızda erkeklere göre kadınlarda IgM seropozitifliği düşük saptansa da klinik sonuçları itibari ile daha riskli grup olarak bilinen kadınlardaki bu sonucun gebelik izleminde olan kadınlar olması toplum sağlığı yönünden düşündürücüdür ve önemlidir. Bu durumun toplumuzda doğurganlık çağında bulunan kadınlardaki aşılama eksikliği ile ilgili olduğu şekliyle değerlendirilmiştir[12,19].

Çalışmamızda, Seroloji/ELISA laboratuvarımızın 6 yıllık IgG avidite verilerini irdelediğimizde 916 olgunun 480 (%52.4)'inin test istemlerinin rutin tarama amaçlı olarak literatürlerde de belirtildiği şekilde kadın doğum kliniği ile ilişkili birimlerden (gebe polikliniği, perinatoloji ve tüp bebek) daha yüksek oranda yapıldığı, 436 (%47.6)'sının test istemlerinin ise enfeksiyon şüphesi ile ağırlıklı olarak çocuk hastalıkları kliniği (çocuk acil, çocuk hastalıkları enfeksiyon, yenidoğan), enfeksiyon hastalıkları kliniği, genel cerrahi transplantasyon servisi, iç hastalıkları (hematoloji, romatoloji, kemik iliği, nefroloji) servisi ve diğer kliniklerden olduğu belirlendi[32].

Çalışmamızda, olgulara ait *T. gondii,* rubella ve CMV IgG avidite indeks sonuçlarının IgM ve IgG serolojilerini irdelediğimizde, testin tanısal algoritmasına uygun olarak IgM pozitif IgG pozitif serolojik paterne sahip 274 (%30) olgu olduğu saptandı. Bunun dışında, avidite testinin tanı algoritmasına uygun olmayan IgM negatif IgG pozitif serolojik paterne sahip 642 (%70) olgu olduğu belirlendi. IgM negatif IgG pozitif saptanan olguların kliniklerden yapılan test istemleri irdelendiğinde; doğrudan üçlü test istemi (IgM, IgG ve IgG avidite) yapıldığı ya da geçmiş testlerinde IgM negatif IgG pozitif olduğu bilinen olgular için IgG avidite test istemi yapıldığı belirlenmiştir. Ayrıca geçmişe dönük serolojileri bilinmeyen olgular için yalnızca IgG avidite test istemlerinin olduğu ancak laboratuvarımız çalışma prensibi gereği IgM ve IgG serolojilerinin de sonrasında çalışıldığı belirlendi. IgM negatif IgG pozitif olup IgG avidite indeks test çalışması yapılan 642 olgunun klinisyenler tarafından uygun olmayan serolojik paterne dönük 3 farklı test istem şekli ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

IgM negatif IgG pozitif serolojiye sahip olguların avidite indekslerini incelediğimizde düşük avidite indeksine sahip 35 (%5.4), yüksek avidite indeksine sahip 590 (%92) olgu olduğu belirlendi. Düşük avidite indeksine sahip olguların dağılımı her üç etkene dönük olarak incelendiğinde, sekizi *T. gondii* (%1.2), 10 (%1.5)'u rubella ve 17 (%2.7)'sinin CMV enfeksiyonu olduğu saptanmıştır. Bu durumun geçen sürede IgM'in negatifleşmesi ve IgG'nin yeni oluşmasıyla ilintili düşük aviditeli IgG'lerin saptanmasıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca literatürlerde düşük avidite indeksine sahip olgularda saptanan IgM antikor negatifliği, *T. gondii,* rubella ve CMV enfeksiyonlarının reenfeksiyon-reaktivasyon durumu ile de ilişkilendirilmektedir[8,13,33]. Avidite testinin istek yapma algoritmasına uygun olmayan şekilde istenen ve %92'sinde yüksek avidite saptanan olguların ağırlıklı olarak kadın doğum kliniği ile ilişkili birimlerden (gebe polikliniği, perinatoloji ve tüp bebek) olması, klinisyenlerin her üç etkene dönük konjenital enfeksiyon riskine karşı erken tanı ve gebeliğin prognozu açısından takiplerinin yapılması hususundaki duyarlılıklarının fazlaca olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Ülkemizde Kayseri'de yapılmış olan bir çalışmada, IgG testi pozitif olan 695 hastada düşük avidite değeri %4.7, yüksek avidite değeri ise %70.8 oranlarında bulunmuştur[8]. İzmir'de *T. gondii* IgG, IgM ve IgA pozitifliği olan 31 gebe kadında yapılmış olan bir çalışmada ise, düşük avidite %25.8 oranında, yüksek avidite ise %45.2 oranında bildirilmiştir[34]. İzmir'de 68 gebe ile yapılmış bir başka çalışmada ise, %23.6 oranında düşük avidite, %55.8 oranında yüksek avidite saptanmıştır[35]. 2010 yılında anabilim dalımızda yapılmış olan çalışmada, Ziver ve ark.[33] %17.5 düşük avidite, %72.5 yüksek avidite değeri saptamıştır. Çalışmamızda, *T. gondii* IgG avidite indeksi saptanan olguların oranları incelendiğinde 52 (%21.4)'sinde düşük avidite, 23 (%9.5)'ünde ara değer ve 168 (%69.1)'inde yüksek avidite belirlenmiştir. Çalışmamızda belirlediğimiz düşük avidite değerli olgu oranımız anabilim dalımızda 10 yıl önce yapılmış olan çalışma[33] sonucundan yüksek saptanmış, yüksek avidite değerli olgu oranımız uyum göster-miştir. Elde ettiğimiz düşük avidite oranımız aynı anabilim dalında önceki yıllara ait verilere göre biraz yükseklik göstermesinin retrospektif olarak incelenen örnek sayısının yüksek olması ve IgM ve IgG birlikte pozitifliği ile ilişkili avidite test istemleri konusunda kliniklerdeki klinisyenlerin tanısal algoritmayla ilintili bilinç düzeylerinin artmasıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

CMV IgG avidite verileri incelendiğinde, Ziver ve ark.[33] yine bu çalışmayı yaptığımız anabilim dalımızın 2008-2009 yıllarına ait verilerini bildirdiği ve 53 olgunun incelendiği retrospektif çalışmada 5 (%9.4) olguda düşük, 45 (%84.9) olguda ise yüksek avidite saptamıştır. Diyarbakır'da ilinde Obut ve ark.[36] yaptıkları çalışmada, 2797 gebe kadın arasında IgM ve IgG'si pozitif saptanan 3 olgunun 3'ünde de yüksek avidite bulunmuştur. Tek başına CMV IgM pozitifliği yalnızca primer enfeksiyona işaret etmemekle birlikte, akut enfeksiyonun yanı sıra reaktivasyonda da yalancı pozitiflikler şeklinde görülebilir. Çalışmamızda, düşük avidite gösteren olguların istek yapılan kliniklere göre dağılımı incelendiğinde yedisi Kadın Doğum-Gebe Kliniği, yedisi çocuk kliniği (yenidoğan servisi ve hematoloji, onkoloji) ve üçü İç Hastalıkları Kliniği (hematoloji)'ne, bir örnek Genel Cerrahi/Transplantasyon Servisi'ne aittir. Avidite testleri akut ve geçirilmiş enfeksiyonun ayırt edilmesinde, özellikle riskli gruplarda akut enfeksiyonun erken teşhisinde kullanılabilir[37]. Düşük avidite akut enfeksiyonu düşündürürken, yüksek avidite 2-4 aydan daha önce geçirilmiş olan bir enfeksiyonu düşündürmektedir. Bu kriter nedeniyle CMV IgG avidite testinin kullanımının özellikle konjenital CMV enfeksiyonları ile immünsüpresif ve malignite tablolu olgularda fırsatçı CMV enfeksiyonlarının primer ya da reenfeksiyon/reaktivasyon tanılarının konulması ve anti-enfeksiyöz tedavi yaklaşımı yönünden önemli olabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda, rubella IgG avidite indeksi saptanan olgular incelendiğinde 19 (%5.6) olguda düşük avidite, 11 (%3.2) olguda ara değer ve 308 (%91) olguda yüksek avidite saptanmıştır. Yine Ziver ve ark.[33] yaptıkları çalışmada, avidite indeksi saptanan 33 olgudan bir (%3) olguda düşük avidite, 30 olguda (%90) yüksek avidite bildirmiştir. Düşük avidite gösteren olgu oranlarında farklılık olmakla birlikte, yüksek avidite olgu oranları anabilim dalımızda yapılmış daha önceki çalışma ile uyum göstermektedir.

Her üç etkene dönük avidite indeks düzeylerinin cinsiyete göre dağılımları irdelendiğinde, düşük avidite indeksine sahip olguların dağılımı kadınlarda *T. gondii* için 47 (%49), rubella için 11 (%11.5) ve CMV için 16 (%16.6)'dır. Buna karşın erkeklerde *T. gondii,* rubella ve CMV için sırasıyla beş (%5.2), sekiz (%8.3) ve dokuz (%9.4)'dur. Literatürleri incelediğimizde avidite indeks düzeylerinin cinsiyetlere göre dağılımı irdelendiğinde kadın hastalarda düşük aviditenin daha yüksek olduğu bulunmuştur[32].

Sonuç olarak, TORCH kompleksinde yer alan 3 etkene ait seroprevalans oranları ve avidite sonuçları incelendiğinde, etkenlerin seropozitiflik oranlarındaki farklılıklar, tarama testleri açısından değerlendirmelerde ayrı ayrı irdeleme yapılması gerekliliğini göstermektedir. Çalışmamızdaki 6 yıllık veriler ülkemizin farklı bölgelerinden yoğun göç alan İstanbul ili

ve Marmara bölgesi yoğun hasta akışının bulunduğu bir üniversite hastanesine başvuran olgulara ait veriler olması nedeniyle önem taşımaktadır Özellikle değerlendirmemizi kapsayan yıllarda verilerin elde edildiği İstanbul merkezli Marmara bölgesinde görülen insan göçünün ve insan hareketliliğinin olasılıkla siyasal, sosyal ve ekonomik faktörlere bağlı artmış olması nedeniyle her üç etkenle ilişkili popülasyon seroprevalans oranlarında değişiklikler görülmektedir. Bu durumun belli zamanlarda periyodik olarak belirlenmesiyle birlikte, toplumsal sürveyanslarının dikkatlice kayda alınması konjenital enfeksiyonlar ve özel klinik tablolara sahip olgularda (konjenital yada maligniteye dönük tedavi sürecinde yada herhangi bir nedenle immünsüpresyon kazanılmış olgular) gelişebilecek fırsatçı enfeksiyonlara maruz kalmamaları açısından da son derece önemli olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Stegmann BJ, Carey JC. TORCH infections. Toxoplasmosis, other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), rubella, cytomegalovirus (CMV), and herpes infections. Curr Womens Health Rep. 2002;2(4):253-8.
2. Neu N, Duchon J Zachariah P, et al. TORCH infections. Clin Perinatol. 2015;42(1):77-103. https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.11.001
3. Joynson DHM, Wreghitt TG. Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide. Petersen E, Dubey JP (Eds) Biology of toxoplasmosis. Cambridge University Press. 2005:1-42.
4. Feldman DM, Timms D, Borgida AF. Toxoplasmosis, parvovirus, and cytomegalovirus in pregnancy. Clin Lab Med. 2010;30(3):709-20. https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.04.009
5. Aboudy Y, Barnea B, Yosef, L, Frank T, Mendelson E. Clinical rubella re-infection during pergnancy in a previously vaccinated woman. J Infect. 2000;41(2): 187-9. https://doi.org/10.1053/jinf.2000.0716
6. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller, M.A. Medical Microbiology, 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1997:419.
7. Güngör S, Aksoy Gökmen A, Uzun B, Er HH, Pektaş B, Kilimcioğlu AA. Bir üçüncü basamak hastanede *Toxoplasma gondii* IgG avidite test istem ve sonuçlarının değerlendirilmesi. J Clin Exp Invest. 2014;5(2):246-9. https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2014.02.0396
8. Yazar S, Yaman O, Şahin İ. *Toxoplasma gondii* seropozitif gebelerde IgG-avidite sonuçlarının değerlendirilmesi. Turkiye Parazitol Derg. 2005;29(4):221-3.
9. Cengiz SD, Kaya C. TORCH Enfeksiyonları. Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics. 2008;1(5):1-10.
10. Duran B, Toktamış A, Erden Ö, Demirel Y, Mamik BA, Çetin M. Doğum öncesi bakımda tartışmalı bir konu: TORCH taraması. CÜ Tıp Fakültesi Derg. 2002;24(4):185-90.
11. Selek MB, Bektore B, Baylan O, Ozyurt M. Üçüncü basamak bir eğitim hastanesinde 2012-2014 yılları arasında gebelerde ve toksoplazmosis şüpheli hastalarda *Toxoplasma gondii*'nin serolojik olarak araştırılması. Turkiye Parazitol Derg. 2015;39:200-4. https://doi.org/10.5152/tpd.2015.3961
12. Aynioglu A, Aynioglu O, Altunok ES. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii,* rubella and cytomegalovirus among pregnant females in north-western Turkey. Acta Clinica Belgica. 2015;70(5):321-4. https://doi.org/10.1179/2295333715Y.0000000021
13. Aleem U, Ullah S, Qasim M, Suliman M. Seroprevalence of Toxoplasmosis in pregnant women in Matta, Upper Swat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. JSMC. 2018;8(2): 103-6.
14. Daryani A, Sarvi S, Aarabi M, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Iranian general population: a systematic review and meta-analysis. Acta Topica. 2014;137:185-94. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.015
15. Tekay F, Ozbek E. The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women from Sanliurfa, a province with a high raw meatball consumption. Turkiye Parazitol Derg. 2007;31(3):176-9.
16. Harma M, Gungen N, Demir N. Toxoplasmosis in pregnant women in Sanliurfa, Southeastern Anatolia City, Turkey. J Egypt Soc Parasitol. 2004;34(2):519-25.
17. Bulut Y, Tekerekoğlu MS, Ağel HS, Otlu B, Direkel Ş, Durmaz, B. Malatya yöresinde dört yıllık sürede toxoplasma antikorlarının dağılımı. Turkiye Parazitol Derg. 2000;24(2):120-1.
18. Dündar Ö, Çelik S, Tütüncü L, Ergür A R, Atay V, Müngen E. 2000-2005 yılları arasında kliniğimizde doğum yapan gebelerde hepatit-B, hepatit-C, HIV, Toksoplazma ve rubella prevalansının araştırılması. Zeynep Kamil Tıp Bülteni. 2009;40(1):1-9.
19. Doğan K, Güraslan H, Özel G, Aydan Z, Yaşar L. Gebelerde *Toxoplasma gondii,* rubella*,* sitomegalovirus, sifiliz ve hepatit B seropozitiflik oranları. Turkiye Parazitol Derg. 2014;38(4):228-33. https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3435
20. Varol FG, Sayin NC, Soysüren S. Trakya yöresinde antenatal bakim alan gebelerde *Toxoplasma gondii*

antikor seroprevalansı. J Turk Soc Obstet Gynecol. 2011;8(2):93-9.
https://doi.org/10.5505/tjod.2011.00533

21. Babür C, Kılıç S, Özkan AT, Esen B. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığında 1995-2000 Yılları arasında çalışılmış Sabin-Feldman dye test sonuçlarının değerlendirilmesi. Turkiye Parazitol Derg. 2002;26(2):124-8.
22. Yazısız H, Öngüt G, Öztürk Eryiğit F ve ark. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Laboratuvarı'nda anti-*Toxoplasma gondii* IgG, IgM ve IgG avidite sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2019;49(2):92-7.
https://doi.org/10.5222/TMCD.2019.092
23. Josheghani BS, Moniri R, Taheri BF, Sadat S, Heidarzadeh Z. Prevalence of serum antibodies to TORCH infection in the first trimester of the pregnancy in Kashan, Iran. IJN. 2015;6(1):8-12.
https://doi.org/10.22038/ijn.2015.4149
24. AL-Jurani AHH. Seroprevalence of anti-cytomegalovirus IgM, IgG antibodies among pregnant women in Diyala province. DJPS. 2014;10(2-part 2):116-22.
25. Puccio G, Cajozzo C, Canduscio LA, et al. Epidemiology of *Toxoplasma* and CMV serology and of GBS colonization in pregnancy and neonatal outcome in a Sicilian population. Ital J Pediatr. 2014;40:23.
https://doi.org/10.1186/1824-7288-40-23
26. Enders G, Daiminger A, Lindemann L, et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996-2010. Med Microbiol Immunol. 2012;201(3):303-9.
https://doi.org/10.1007/s00430-012-0232-7
27. Çeltek NY, Tetikçok R, Günal Ö, ve ark. Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesi'nde gebelerde Rubella, CMV ve toksoplazmozis seroprevalansı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2014;6(1):54-62.
28. Keskin DD, Keskin S. İlk trimester gebelerde *Toksoplasma,* rubella*,* CMV, HBV, AntiHBs, HCV, HIV seroprevelansları. Selçuk Tıp Derg. 2013;29(3):123-6.
29. Pandolfi E, Gesualdo F, Rizzo C, et al. Global seroprevalence of rubella among pregnant and childbearing age women: a meta-analysis. Eur J Public Health. 2017;27(3):530-7.
https://doi.org/10.1093/eurpub/ckw259
30. Çetinkaya RA, Yenilmez E. The seroprevalence of Rubella in pregnant women in Turkey: a meta-analysis research of 90988 Rubella IgM, 84398 Rubella IgG, and 522 avidity results. Turk J Obstet Gynecol. 2019; 16(1):63-71
https://doi.org/10.4274/tjod.galenos.2018.89663
31. Akıncı P, Altuğlu İ, Sertöz R, Zeytinoğlu, A. İzmir'deki gebelerde rubella ve sitomegalovirüs enfeksiyonu seroprevalansi. Infeks Derg. 2007;21(4):183-6.
32. Aydın Türkoğlu Ş, Karabörk Ş, Çakmak M, Orallar H, Yaman K, Ayaz E. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesine başvuran hastalarda 6 yıllık *Toxoplasma gondii* seropozitifliğinin araştırlması. Turkiye Parazitol Derg. 2018;42(2):106-2.
https://doi.org/10.5152/tpd.2018.5458
33. Ziver T, Yüksel P, Aslan M ve ark. *Toxoplasma gondii,* sitomegalovirus ve rubella enfeksiyonlarının tanısında avidite testleri: Ocak 2008-Aralık 2009 tarihleri arasındaki sonuçların değerlendirilmesi. Klimik Derg. 2010;23(3):105-9
https://doi.org/10.5152/kd.2010.29
34. Bahar İH, Karaman M, Kırdar S, Yılmaz Ö, Celiloğlu M, Mutlu D. Gebelikte toxoplasmosis tanısında anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgG, IgA antikor ve IgG avidite testlerinin birlikteliği ve önemi. Turkiye Parazitol Derg. 2005;29(2):76-9.
35. Özdemir R, Er H, Baran N, Vural A, Kurultay N. *Toxoplasma gondii* IgG-IgM antikorları pozitif gebelerde IgG avidite sonuçlarının değerlendirilmesi. İnfeks Derg. 2008;22(4):219-22.
36. Obut M, Doğan Y, Bademkıran MH, ve ark. Diyarbakır ilindeki gebe kadınlarda *Toksoplazma,* rubella ve sitomegalovirus seroprevalansı. Dicle Tıp Derg. 2019;46(2):189-94.
https://doi.org/10.5798/dicletip.539888
37. Karakoç ZÇ, Tasçioglu D, Tekin S, Simsek B. Sağlıklı erişkinde akut sitomegalovirüs hastalığı: Dört olgu sunumu. Klimik Derg. 2016;29(1):39-42.
https://doi.org/10.5152/kd.2016.09

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):44-8
doi:10.5222/TMCD.2020.044

Araştırma / *Research Article*

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Antimikrobiyal Direnci Açısından İncelenmesi[§]

Investigation of Antimicrobial Resistance of Stenotrophomonas maltophilia Strains Isolated from Clinical Specimens

Melike Orkide Taşçılar, Zafer Habip, Tuncer Özekinci, Mücahide Esra Koçoğlu

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

ÖZ

Amaç: *Stenotrophomonas maltophilia son yıllarda daha sık izole edilen, nozokomiyal bir enfeksiyon etkenidir. Antimikrobiyal ajanların büyük çoğunluğuna karşı içsel dirence sahip olması nedeniyle tedavisi oldukça zordur. Bu çalışma, çeşitli klinik örneklerden izole edilen S. maltophilia suşlarında antimikrobiyal direnç yüzdelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.*

Yöntem: *Çalışmamıza laboratuvarımıza 1 Ocak 2017-31 Aralık 2018 tarihleri arasında servislerden gönderilen tüm kültür örnekleri dâhil edilmiştir. Patojen olarak değerlendirilen suşların 105'i, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight MassSpectrometry (MALDI-TOF MS, bioMérieux, Fransa) cihazı ile S. maltophilia olarak tanımlanmıştır. Trimetoprim-sülfametoksazol için antibiyotik duyarlılık testleri Vitek 2 compact (bioMérieux, Fransa) cihazı ve Kirby-Bauer yöntemi ile paralel çalışılmış, "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) kriterleri doğrultusunda çalışılıp değerlendirilmiştir. Levofloksasin ve seftazidim için antibiyotik duyarlılıkları için antibiyotik gradient test (E-test, bioMérieux, Fransa) ve CLSI standartlarına göre çalışılmış ve değerlendirilmiştir.*

Bulgular: *41 trakeal aspirat, 16 kan, 14 idrar, 12 balgam, 7 yara, 6 bronkoalveolar lavaj, beş aspirat, iki doku ve ikisi safra sıvısı örneklerinden izole edilen toplam 105 adet S. maltophilia izolatı çalışılmıştır. Tüm suşların %12.6'sı trimetoprim-sülfametoksazol dirençli bulunmuştur. Alternatif antibiyotikler olan levofloksasin ve seftazidim için direnç oranları sırasıyla %14.5 ve %65.9'dur.*

Sonuç: *S. maltophilia enfeksiyonlarında levofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol'e iyi bir alternatif gibi görünmektedir. Antimikrobiyal direnç oranları değişiklik gösterebileceği için her hastane kendi antimikrobiyal direnç oranlarını takip etmeli, ampirik tedavi politikası her hastanenin kendi direnç durumuna göre belirlenmelidir.*

Anahtar kelimeler: *Stenotrophomonas maltophilia, antimikrobiyal direnç, Kirby-Bauer, E-test*

ABSTRACT

Objective: *Stenotrophomonas maltophilia is a nosocomial infection agent that has been isolated more frequently in recent years. Treatment is quite difficult because of its intrinsic resistance to the majority of antimicrobial agents. This study was carried out to determine the antimicrobial resistance rates of S. maltophilia strains isolated from various clinical specimens.*

Method: *All culture samples submitted to our laboratory between 1st January 2017 and 31st December 2018 from services were included in our study. A total of 105 strains evaluated as pathogenic microorganisms were identified as S. maltophilia with the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS, bioMérieux, France). Antimicrobial susceptibility tests for trimethoprim-sulfamethoxazole were conducted in paralel with the Vitek 2 compact (bioMérieux, France) device and Kirby-Bauer method. The results were processed, and evaluated according to "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) criteria Antibacterial susceptibilities of levofloxacin and ceftazidim were studied, and evaluated based on antibiotic gradient test (E-test, bioMérieux, France) and CLSI standards.*

Results: *Total of 105 S. maltophilia strains isolated from 41 tracheal aspirates, 16 blood, 14 urine, 12 sputum samples, seven wound sites, six bronchoalveolar lavage samples, five aspirates, two tissue, and two bile samples were analyzed. While, 12.6% of the strains were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. Resistance rates for levofloxacin and ceftazidime as alternative antibiotics were e 14.5% and 65.9%, respectively. The resistance profiles of the isolates obtained from blood culture for trimethoprim-sulfamethoxazole, levofloxacin and ceftazidime were 43.8%, 8.3% and 33.3% respectively.*

Conclusion: *In S. maltophilia infections, levofloxacin appears to be a good alternative to trimethoprim-sulfamethoxazole. As antimicrobial resistance rates may vary, each hospital should follow its own antimicrobial resistance rates, and empirical treatment policy should be determined according to each hospital's own antimicrobial resistance status.*

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia, antimicrobial resistance, Kirby-Bauer, E-test*

Alındığı tarih / Received:
03.10.2019 / 03.October.2019

Kabul tarihi / Accepted:
03.11.2019 / 03.November.2019

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

M. O. Taşçılar 0000-0002-2794-0735
Z. Habip 0000-0002-9624-7790
T. Özekinci 0000-0003-3475-660X
M. E. Koçoğlu 0000-0002-2860-1794

✉ tascilarmelike@gmail.com

[§] *Bu araştırma 34. Ankem Kongresi (1-5 Mayıs 2019, Marmaris)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.*

Atıf: Taşçılar MO, Habip Z, Özekinci T, Koçoğlu ME. Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antimikrobiyal direnci açısından incelenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):44-8.

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Stenotrophomonas maltophilia, fırsatçı bir nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak giderek artan sıklıkta karşımıza çıkmaktadır. *S. maltophilia*, aerop, Gram negatif basildir. Kanlı agarda kolonilerin rengi gri veya lavanta-yeşildir. Genelde oksidaz negatif, lizin dekarboksilaz, DNAaz pozitiftir. Katalaz, lipaz, esteraz, musinaz ve hyalurinidaz enzimlerine sahiptir. Laktoz, glikoz, ksiloz ve maltozu oksidatif yol ile kullanmaktadır. *''Maltophilia''* ismi maltozu okside etmesinden gelmektedir[1-3].

Nozokomiyal enfeksiyonlar, altta yatan hastalıkları nedeniyle hastanede yatmakta olan, invaziv girişimlere maruz kalan, hastanede yatış süreleri uzamış hastalarda meydana gelmektedir. *S. maltophilia* nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmasının yanı sıra çoğul dirençli bir bakteridir. Nozokomiyal enfeksiyonların tedavisi genellikle çoğul dirençli bakterilerle gelişmesi nedeniyle hastane dışında gelişen enfeksiyonların tedavisine göre daha yüksek maliyetlidir[4].

Stenotrophomonas maltophilia kommensal bir bakteri olmasının yanı sıra immünsüpresif bireylerde fırsatçı patojen olarak karşımıza çıkabilmektedir. Önceden *S. maltophilia* ile ilgili olarak virulan olmadığı, önemli bir hastane kökenli fırsatçı patojen olduğu şeklinde düşünülmekte iken, son yıllardaki yayınlarda aksine güçlü patojenik özelliklerinden dolayı artık patojen sınıfında kabul edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Pnömoni, bakteriyemi, nekrotizan otitis, yumuşak doku enfeksiyonları, keratit, endokardit ve menenjit yaptığı bilinmektedir[5].

*Stenotrophomonas maltophilia'*nın tedavisinde ilk tercih edilmesi gereken antibiyotik olan trimetoprim-sülfametoksazol'e direnç kazanması ve aşırı duyarlılık, böbrek yetmezliği, kemik iliği depresyonu gibi yan etkileri nedeniyle alternatif ilaçlara gereksinim duyulmak-tadır[6-9].

β-laktamlar, aminoglikozidler gibi çeşitli antibiyotik sınıflarına içsel dirençli olduğu bilinen *S. maltophilia'*nın tedavisinde, in-vitro olarak etkili bulunan fluorokinolonlar trimetoprim-sülfametoksazol'e alternatif ilaçlardır[9-11].

Bu çalışma, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. maltophilia* suşlarında trimetoprim-sülfametoksazol, levofloksasin ve seftazidim direnç oranlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza, laboratuvarımıza 1 Ocak 2017-31 Aralık 2018 tarihleri arasında servislerden gönderilen kültür örneklerinden üreme olması hâlinde, her hastanın *S. maltophilia* izole edilen bir örneği dâhil edilmiştir. Balgam, trakealaspirat, bronkoalveolar lavaj, aspirat, doku, safra sıvısı örnekleri ile BacT/Alert 3D Sisteminde (bioMérieux, Fransa) pozitif sinyal veren kan kültürü örnekleri, çikolata agar ve EosinMethylen Blue agar (EMB, bioMérieux, Fransa) besiyerlerine ekim yapılmış, 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İdrar örnekleri ise kromojenik agar (CHROMagar™ Orientation, CHROMagar, Fransa) ve kanlı agar besiyerlerine ekim yapılmış, 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Direk preperattan hazırlanan Gram boyamalar x100 objektifte incelenmiştir.

Patojen olarak değerlendirilen suşlar, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight, MassSpectrometry (MALDI-TOF MS, bioMérieux, Fransa) cihazı ile tanımlanmıştır. Trimetoprim-sülfametoksazol için antibiyotik duyarlılık testleri Vitek 2 compact (bioMérieux, Fransa) cihazı ve Kirby-Bauer yöntemi ile paralel çalışılmış, "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) kriterleri doğrultusunda çalışılıp değerlendirilmiştir[12]. Levofloksasin ve seftazidim için antibiyotik duyarlılıkları için antibiyotik gradient test (E-test, bioMérieux, Fransa) ve CLSI standartlarına göre çalışılmış ve değerlendirilmiştir[13].

BULGULAR

Ocak 2017-31 Aralık 2018 tarihleri arasında servislerden

laboratuarımıza gönderilen kültür örneklerinden üreyen patojenlerin 105'i S. maltophilia olarak tanımlanmıştır. *S. maltophilia* izole edilen örneklerin 41'i trakeal aspirat, 16'sı kan kültürü, 14'ü idrar, 12'si balgam, yedisi yara, altısı bronkoalveolar lavaj, beşi aspirat, ikisi doku ve ikisi safra sıvısıdır (Tablo 1). Bu suşların %12.6'sı trimetoprim-sülfametoksazol dirençli bulunmuştur. Alternatif antibiyotikler olan levofloksasinve seftazidim için direnç oranları sırasıyla %14.5 ve %65.9'dur (Tablo 2). Kan izolatlarında trimetoprim-sülfametoksazol %43.8, levofloksasin %8.3, seftazidim %33.3 dirençli bulunmuştur.

Tablo 1. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının izole edildiği örnekler.

Örnek	Sayı (%)
Trakeal aspirat	41 (39.0)
Kan	16 (15.2)
İdrar	14 (13.3)
Balgam	12 (11.4)
Yara	7 (6.7)
Bronkoalveoler lavaj	6 (5.8)
Aspirat	5 (4.8)
Doku, safra sıvısı	4 (3.8)
Toplam	105 (100.0)

Tablo 2. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının direnç oranları.

Antibiyotik	Direnç oranı (%)
Trimetoprim-sülfametoksazol	12.6
Levofloksasin	14.5
Seftazidim	65.9

TARTIŞMA

In vitro olarak *S. maltophilia'*ya karşı etkili görünse bile tedavide kullanılabilecek ilaç sayısı oldukça sınırlıdır. *S. maltophilia* karbapenemlere kromozomal genleriyle kodladığı β-laktamaz enzimiyle, aminoglikozidlere de yine kromozomal genleriyle kodladığı aminoglikozid asetiltransferaz enzimiyle direnç gösterirken, trimetoprim-sülfametoksazol ve kinolonlara ise kazanılmış direnç genleri aracılığıyla direnç göstermektedir[14,15].

Cho ve ark.[16] 2014 yılında, hematolojik maligniteli hastaların kan kültüründen izole edilen *S. maltophilia* suşları ile yaptıkları bir çalışmada, trimetoprim-sülfametoksazol direnci %11.1, levofloksasin %56, seftazidim %88.9 olarak bulunmuştur.

Bugüne kadar Türkiye'nin çeşitli illerinde *S. maltophilia* suşlarında yapılan çalışmalarda, trimetoprim-sülfametoksazol için birbirinden çok farklı direnç oranları ile karşılaşılmıştır. Caylan ve ark.[17] 2000-2001 yılları arasında 41 hastadan elde edilen izolatlarla yaptıkları bir çalışmada, trimetoprim-sülfametoksazol direnç oranı %2.3 olarak bulunmuştur. Zer ve ark.[18] tarafından 2007 yılında 72 suşla yapılan bir çalışmada da trimetoprim-sülfametoksazol direnç oranı %2.7 olarak belirlenmiştir. 2013 yılında Çaycı ve ark.[19] yaptığı bir çalışmada, trimetoprim-sülfametoksazol direnci %7.2 olarak belirlenmiştir. Sadıç ve ark.[20] 2019 yılında İstanbul'da yaptığı bir çalışmada ise, 2007-2017 yılları arasında toplanan *S. maltophilia* suşlarında trimetoprim-sülfametoksazol direncini %8 olarak belirlenmiştir. Çıkman ve ark.[21] Erzincan ve Van illerinde, 116 *S. maltophilia* suşu ile gerçekleştirdikleri çalışmada ise, trimetoprim-sülfametoksazol direncini %20.3 olarak bulmuştur. Hazırolan ve ark.[22] trimetoprim-sülfametoksazol direncini 2016 yılı için %11.36 olarak belirlemişlerdir. Özkaya ve ark.'nın[23] yaptıkları bir çalışmada, trimetoprim-sülfametoksazol direnci %9.4 olarak bulunmuştur. Ülkemizdeki veriler değerlendirildiğinde yıllar içinde artan bir trimetoprim-sülfametoksazol direnci olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda ise trimetoprim-sülfametoksazol direnci %12.6 bulunarak, Türkiye genelinde bugüne kadar bildirilen direnç oranları aralığında (%0-20.3) bir değer elde edilmiştir. Ancak 2010 yılından önceki yapılan çalışmalardaki oranlara göre daha yüksektir.

Chung ve ark.[24] 2013 yılında Kore'de yaptıkları bir çalışmada, levofloksasin direncini %20 olarak bulmuştur. Wei ve ark.'nın[25] 2015 yılında agardilüsyon yöntemi ile yaptıkları yaptıkları bir çalışmada, levofloksasin direnci %24.7'dir. 2013 yılında Çaycı ve ark.'nın[19] Türkiye'de yaptığı çalışmada ise, levofloksasin direnci %11.5 olarak bulunmuştur. Çıkman ve ark.[21] 2016 yılındaki çalışmalarında, levofloksasin direncini %7.6 olarak bildirmişlerdir. Şen ve ark.[26]

İzmir'de yaptıkları çalışmada, levofloksasin direncini %14.3 olarak bildirmişlerdir. Kandemir ve ark.[27] Diyarbakır'da levofloksasin direncini %23 olarak bulmuşlardır. Hazırolan G ve ark.[22] levofloksasin direncini 2015 yılında %17.39 olarak belirlemişlerdir. Ülkemizde *S. maltophilia* suşlarında levofloksasin direncinin %20'lere ulaştığı gözlenmektedir. Bizim çalışmamızda ise levofloksasin direnci %14.5 olarak bulunmuştur.

Stenotrophomonas maltophilia suşlarında seftazidim için yüksek oranda direnç görülmektedir. 1998-2001 yılları arasında çocuk hastalardan toplanan 35 *S. maltophilia* suşunda yapılan bir çalışmada seftazidim direnci %37.5 olarak belirlenmiştir[28]. Zer ve ark.[18] tarafından 2007-2008 yıllarında Gaziantep'te yapılan çalışmada, suşların %88.8'i seftazidime dirençli olarak bulunmuş, 3. kuşak sefalosporinlerin *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde yerinin olamayacağı sonucuna varılmıştır. Çıkman ve ark.'nın[21] Erzincan ve Van illerinde yaptıkları çalışmada, seftazidim direnci %75'tir. Çaycı ve ark.[19] 2013 yılında yaptıkları çalışmada ise seftazidim direncini %53.5 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise seftazidim direnci %65.9 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda, tüm örnekler içinde en yüksek direnç seftazidimde görülmüştür ve tüm örnekler içinde trimetoprim-sülfametoksazol için en yüksek direnç (%43.8) profili kan kültürü izolatlarındadır. 2006-2013 yılları arasında mikrobiyoloji laboratuvar verileri ve enfeksiyon kontrol komitesi raporlarını retrospektif olarak inceleyen bir çalışmada, pnömonili hasta grubunda trimetroprim-sülfametoksazol dirençli suş yokken, bakteriyemili hasta grubunda ise suşların %17'si trimetroprim-sülfametoksazole dirençli olarak bulunmuştur[29].

Stenotrophomonas maltophilia enfeksiyonları, bakterinin birçok antibiyotiğe doğal dirençli olması nedeniyle tedavisi güç enfeksiyonlardır. Direnç oranlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar, klinisyenlere ampirik antimikrobiyal terapiye başlarken uygun ajan seçiminde ışık tutmaktadır. Antimikrobiyal direnç oranları bölgeden bölgeye, ilden ile hatta hastaneden hastaneye farklılık göstermektedir; bu nedenle her hastane kendi antimikrobiyal direnç oranlarını takip etmeli, ampirik tedavi politikası her hastanenin kendi direnç durumuna göre belirlenmelidir. Yıllara göre direnç artışı olmakla birlikte *S. maltophilia* enfeksiyonlarında ilk seçenek olarak trimetroprim-sülfametoksazol, ikinci seçenek olarak da levofloksasin olarak görülmektedir. CLSI, antibiyotik duyarlılık test edilmesinde β-laktam antibiyotiklerden seftazidimin çalışılmasını önermektedir. EUCAST ise hiç bir β-laktam antibiyotiğin çalışılmasını önermemektedir. Çalışmamızda ve ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda çıkan yüksek direnç nedeniyle *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde β-laktam antibiyotiğin kullanılmasının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Yüksek orandaki seftazidim direnci nedeniyle, hastanemizde hekimler ampirik tedavide 3. kuşak sefalosporinleri tercih etmemelidirler.

KAYNAKLAR

1. Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. Int J Syst Bacteriol. 1993;43(3):606-9. https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-606
2. Brooks G, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. O.Şadi Yenen (Çeviri Ed.), Nobel Tıp Kitapları, 2014.
3. Bayraktar B, Kaygusuz A, Öngen B, ve ark. *Xanthomonas maltophilia* izolasyonları. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 1994;24(1):154-7.
4. Dülger D, Berktaş M. Stenotrophomonas maltophilia suşlarının klinik önemi. Van Tıp Derg. 2007;14(3):90-5.
5. Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: looking beyond contemporary antibiotic therapy. Front Microbiol. 2017;30(8):2276. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02276
6. Hu LF, Xu XH, Li HR, et al. Surveillance of antimicrobial. susceptibility patterns among *Stenotrophomonas maltophilia* isolated in China: during the 10-year period of 2005-2014. J Chemother. 2018;30(1):25-30. https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1378834
7. Lawson DH, Paice BJ. Adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole. Rev Infect Dis 1982;4(2):429-33. https://doi.org/10.1093/clinids/4.2.429
8. Ho JM, Juurlink DN. Considerations when prescribing

trimethoprim-sulfamethoxazole. CMAJ. 2011;183(16): 1851-8.
https://doi.org/10.1503/cmaj.111152

9. Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, et al. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. J Antimicrob Chemother. 2008;62(5):889-94. https://doi.org/10.1093/jac/dkn301
10. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):2-41. https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11
11. Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh PR. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. Front Microbiol 2015;6:893. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00893
12. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST Documents Ver. 8.1, 2018.
13. CLSI. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentyfifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Institute. Document M100-S23, 2013.
14. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome Biol. 2008;9(4):R74. https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r74
15. Toleman, MA, Bennett PM, Bennett DN, Jones RN, Walsh TR. Global emergence of trimethoprim/ sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. Emerg Infect Dis. 2007;13(4):559-65. https://doi.org/10.3201/eid1304.061378
16. Cho SY, Lee DG, Choi SM, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection in patients with hematologic malignancies: a retrospective study and in vitro activities of antimicrobial combinations. BMC Infect Dis. 2015;15:69. https://doi.org/10.1186/s12879-015-0801-7
17. Caylan R, Kaklikkaya N, Aydin K, ve ark. An epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in a university hospital. Jpn J Infect Dis. 2004;57(2):37-40.
18. Zer Y, Karaoğlan İ, Çevik S, Erdem M. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının irdelenmesi. Klimik Derg 2009;22(1):21-4.
19. Tanrıverdi Çaycı Y, Karadağ A, YılmazH, Yanık K, Günaydın M. *Stenotrophomonas maltophilia* klinik suşlarında antimikrobiyal direnç. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2013;43(1):22-5. https://doi.org/10.5222/TMCD.2013.022
20. Sadıç B, Başaran S, Yavuz S, Çağatay A, Özsüt H, Eraksoy H. *Stenotrophomonas maltophilia:* Antimikrobik duyarlılık testi sonuçları ve seftazidimin moksifloksasinle kombinasyonunun in vitro etkinliği. Klimik Derg. 2019;32(1):29-34. https://doi.org/10.5152/kd.2019.08
21. Çıkman A, Parlak M, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Berktaş M. Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. Afr Health Sci. 2016;16(1):149-52. https://doi.org/10.4314/ahs.v16i1.20
22. Hazırolan G, Araz H, Çelikbaş AK, Aksu N. Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının trimetoprim-sülfametoksazol ve levofloksasin direncinde belirgin artış var (2208-2016). Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2018;48(2):134-40. https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.134
23. Özkaya Esra, et al. Klinik örneklerden izole edilen trimetoprim-sülfametoksazole dirençli *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında integron, sul1-2 ve *dfr* genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2014;48(2):201-12. https://doi.org/10.5578/mb.7262
24. Chung HS, Hong SG, Kim YR, et al. Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Korea, and the activity of antimicrobial combinations against the isolates. J Korean Med Sci. 2013;28(1):62-6. https://doi.org/10.3346/jkms2013.28.1.62
25. Wei C, Ni W, Cai X, Zhao, Cui J. Evaluation of trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), minocycline, tigecycline, moxifloxacin, and ceftazidime alone and in combinations for SXT-susceptible and SXT-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* by in vitro time kill experiments. PLoS One. 2016;11(3): e0152132. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152132
26. Şen P, Yula E, Er H, ve ark. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında antibiyotiklere direnç oranı. Ortadoğu Tıp Derg. 2017;9(3):113-7. https://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.265431
27. Kandemir İ, Özcan N, Alanbayı Ü, Bozdağ H, Akpolat N, Gül K. Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Dicle Tıp Derg.2016;43(2):237-40. https://doi.org/ 10.5798/diclemedj.0921.2016.02.0673
28. Köseoğlu Ö, Şener B, Gür D. Çocuk hastalardan izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının moleküler epidemiyolojisi. Mikrobiyol Bul. 2004;38(1-2):9-19.
29. Gozel MG, Celik C, Elaldı N. *Stenotrophomonas maltophilia* infections in adults: primary bacteremia and pneumonia. Jundishapur J Microbiol. 2015;22(8):e23569. https://doi.org/ 10.5812/jjm.23569

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):49-55
doi:10.5222/TMCD.2020.049

Araştırma / *Research Article*

Türkiye'den Elde Edilen Kutanöz *Leishmaniasis* Etkeni İzolatların Sıvı Besiyerlerindeki Üremelerinin Karşılaştırılması

The Comparison of the Reproduction Rates of Leishmania Isolates in Liquid Culture Media which are Causative Agents of Cutaneous Leishmaniasis in Turkey

Yalçın Demir, İbrahim Çavuş, Ahmet Özbilgin

Manisa Celal Bayar Tıp Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa

ÖZ

Amaç: *Bu proje, moleküler araştırmalarda, izoenzim analizlerinde ve ilaç çalışmalarında kullanılabilecek olan Leishmania promastigotlarını en kısa sürede en fazla üreten sıvı besiyerini saptamak amacıyla planlanmıştır.*
Yöntem: *Sıvı azot tankında saklanan, Türkiye'deki kutanöz leishmaniasis (KL) hastalarından elde edilen Leishmania spp. suşları uygun ortamda çıkarılıp canlandırılmış ve Novy-McNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekimleri yapılmıştır. NNN besiyerinde üretilen izolatlar çalışmaya alınmıştır. Üremeleri sağlanan izolatların gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla internal transcribed spacer-1(ITS-1) gen bölgesine özgü primer ve problar ile genotiplemeleri yapılmıştır. Türkiye'deki KL hastalarından elde edilen ve yapılan genotipleme sonucu Leishmania tropica, Leishmania major ve Leishmania infantum/donovani olarak tür tayinleri yapılan izolatlardan birer tanesi çalışmaya alınmış ve RPMI 1640, M199, Schneiders Medium, Nutrient Broth, Brain Heart Broth besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekimleri yapılan besiyerleri Thoma lamı yardımıyla 12 gün boyunca kontrolleri yapılarak üreme yoğunlukları hesaplanmıştır.*
Bulgular: *Türkiye'deki KL hastalarından elde edilmiş ve tür tayini yapılmış L. tropica, L. major ve L. infantum/donovani izolatlarının 8. günden itibaren RPMI 1640 besiyerindeki üreme yoğunluğu M199, Schneiders Medium, Nutrient Broth, Brain Heart Broth besiyerlerine göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Ekim yapılan promastigotların her 3 tür içinde 10. günden sonra kullanılacak yoğunluğa ulaştığı görülmüştür.*
Tartışma: *Türkiye'den izole edilen KL etkeni Leishmania türlerinde çok sayıda Leishmania promastigotuna gereksinim olduğu durumlarda en iyi sıvı besiyerinin RPMI 1640 olduğu saptanmıştır. Daha sonra ise sırasıyla M199, Schneiders Medium, Brain Heart Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinin tercih edilmesinin uygun olacağı düşüncesine varılmıştır.*

Anahtar kelimeler: *Kutanöz Leishmaniasis, Leishmania besiyerleri, Türkiye*

ABSTRACT

Objective: *The aim of this study is to determine the best liquid culture medium, which could reproduce highest number of Leishmania promastigotes to be potentially used in molecular studies, isoenzyme analyses and drug studies in the shortest time.*
Method: *Leishmania spp. strains stored in liquid nitrogen tanks were revitalized and inoculated into Novy-McNeal-Nicolle (NNN) culture medium. The isolates reproduced in the culture medium were genotyped via real time PCR, using primers and probes spesific to internal transcribed spacer-1 sequence. The isolates, obtained from the patients with cutaneous leishmaniasis in Turkey and were initially genotyped as Leishmania tropica, Leishmania major and Leishmania infantum/donovani, were inoculated into RPMI 1640, M199, Schneiders Medium, Nutrient Broth and Brain Heart (infusion) Broth culture media. Inoculated culture media were checked every day up to 12th day after inoculation and their reproduction density was assessed on hemocytometer.*
Results: *It has been observed that Leishmania tropica, L. major and L. infantum/donovani isolates, obtained from the patients with cutaneous leishmaniasis in Turkey, can be reproduced in RPMI 1640 culture medium better than M199, Schneider's Medium, Nutrient Broth, Brain Heart Broth culture media, with much more promastigote reproduction. For all three Leishmania spp. inoculated promastigots reached the required reproduction density suitable for use beginning from the 8th day ($p<0.05$).*
Conclusion: *It has been concluded that RPMI 1640 was the most suitable medium when higher number of Leishmania promastigotes are needed, followed by preference for M199, Schneider's Medium, Brain Heart Broth and Nutrient Broth media in that order.*

Keywords: *Cutaneous Leishmaniasis, Leishmania culture media, Turkey*

Alındığı tarih / Received:
15.11.2019 / 15.November.2019
Kabul tarihi / Accepted:
27.11.2019 / 27.November.2019
Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

Y. Demir 0000-0001-7790-8920
İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ icvs26@yahoo.com

Atıf: Demir Y, Çavuş İ, Özbilgin A. Türkiye'den elde edilen kutanöz *Leishmaniasis* etkeni izolatların sıvı besiyerlerindeki üremelerinin karşılaştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):49-55.

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* türü zorunlu hücre içi parazitlerin neden olduğu paraziter bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre endemik bölgede yaşayan 1 milyar insan leishmaniasis riski altındadır. Her yıl 300.000 visseral leishmaniasis (VL) olgusu bildirilirken, son beş yılda 1 milyon kutanöz leishmaniasis (KL) olgusu bildirilmiştir[1]. *Leishmania* türleri memelilerin zorunlu hücre içi parazitidirler ve enfekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar (yakarca) tarafından kan emme sırasında bulaştırılmaktadırlar[2-4]. Morfolojik olarak ayırt edilemeyen *Leishmania* türleri klinik olarak VL, KL ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo oluşturur. *Leishmania donovani'*nin VL etkeni olduğu alanlarda tedavi sonrası deride ortaya çıkan ve post kala-azar dermal leishmaniasisi (PKDL) olarak adlandırılan klinik tablo da son yıllarda dördüncü klinik şekil olarak kabul edilmiştir[5].

Ülkemizde Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde *Leishmania tropica'*nın etken olduğu KL görülmektedir[6]. Birçok ülkede kentleşme, tarımsal gelişmeye paralel göç hareketlerinin artması ve her geçen yıl HIV/AIDS'in yaygınlaşması nedeniyle leishmaniasisin hem bulaş yolları artmış hem de yayılımı hız kazanmıştır. Kendiliğinden iyileşmesi genelde bir yıl sürdüğü için ülkemizde halk arasında "yıl çıbanı" adı da verilen KL ise daha çok, uzun sürede geçmeyen, özellikle yüz ve ellerde görülen ülser ile kendini gösterir[7].

Her ne kadar leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıksa da, günümüzde bile bu hastalığın kontrolü için harcanan çabalar yetersiz kalmaktadır. Bu durumun ortaya çıkmasında, hastalığın klinik formları arasında geniş farklılık olması ve bunların epidemiyolojik durumlarının her bölgeye özgü kontrol prensip ve yöntemlerine gereksinim göstermesi büyük rol oynar. Herhangi bir sağaltım uygulanmasa bile kendiliğinden geçen ve kişiyi bağışık hâle getiren KL'in neden olduğu yara izleri ise hayat boyu vücutta kalarak estetik açıdan sorun yaratmaktadır.

Kutanöz leishmaniasisde sağlam deri ile lezyonun birleştiği bölgeden iğne aspirasyonu ile alınan materyalden yapılan yayma preparatların Wright veya Giemsa boyama yöntemi ile boyanarak amastigotların görülmesi veya bu materyallerin Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekilerek promastigotların üretilerek tanı konulması leishmaniasis tanısında altın standart olarak kabul edilir. *Leishmania* türlerinin tanısında veya promastigotların elde edilmesinde en çok NNN besiyeri kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda *Leishmania* türleri üzerine yapılan moleküler araştırmalarda, izoenzim analizlerinde, ilaç, immunolojik ve biyokimyasal çalışmalarda çok miktarda promastigota gereksinim duyulmaktadır.

Çalışmamızda, Türkiye'deki KL hastalarından elde edilen *L. tropica, Leishmania major* ve *Leishmania infantum/donovani* izolatlarından çeşitli çalışmalarda kullanılmak üzere fazla ve bol sayıda promastigot elde etmek için çeşitli besiyerlerinde üreme hız ve yoğunlukları araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

***Leishmania* spp. izolatlarının sıvı azot tankından çıkarılıp üretilmesi:** Bu çalışmada, ülkemizde KL hastalarından izole edilen yerli *Leishmania* spp. suşları kullanılmıştır. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı'nda bulunan Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan izolatlar, sıvı azot tankından uygun koşullar altında çıkarılmış ve NNN besiyerine ekimleri yapılmıştır. NNN besiyerleri 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. NNN besiyerleri gün aşırı kontrol edilmiştir. Üreme gözlenen NNN besiyerlerindeki promastigot sayısı 10^5 promastigot/ml olunca genotipleme ve besiyerlerine ekimleri yapılarak çalışmaya başlanmıştır.

***Leishmania* spp. izolatlarının genotiplendirilmesi:** İzolatların DNA izolasyonu "Roche High Pure PCR Template Preparation Kit" ile firmanın önerisi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan elde edilen DNA örnekleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemi ile çalışılana kadar

-20°'de saklanmıştır.

Genotipleme analizi için *Leishmania* spp. özgü ITS-1 problu GZ-PZR testi uygulanmıştır.

Forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', Reverse Primer; 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' primerleri, QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı ile birlikte aşağıda yazılı özgün problar kullanılarak çoğaltılmıştır[8].

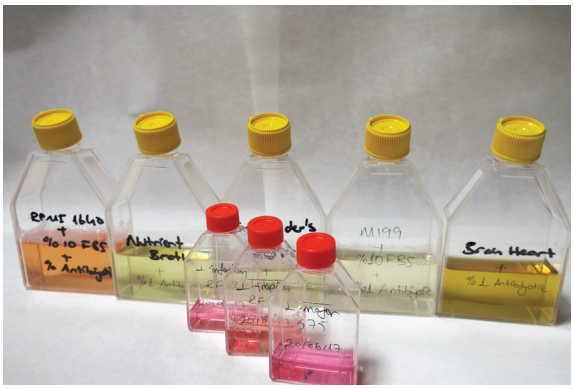
Probe1:5'-CCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTT-Fluo-3'
Probe 2: 5'-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-Pho-3'

Analiz için hazırlanan toplam 25 µL'lik reaksiyon karışımı; 1.5 µL H_20 (PCR grade water), 1 µL Forward Primer, 1 µL Reverse Primer, 0.5 µL Probe1, 0.5 µL Probe2, 12.5 µL QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (Qiagen) ve 5 µL genomik DNA içermektedir.

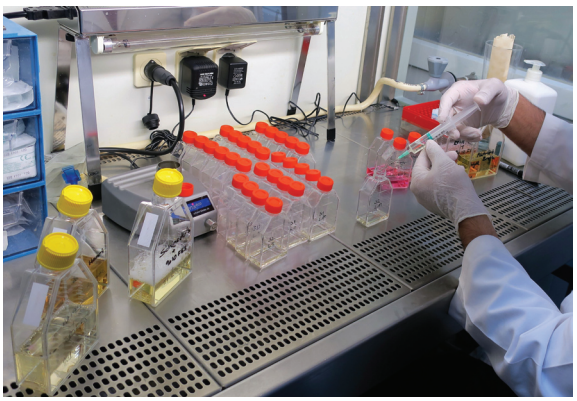
Genotipleme analizi GZ-PRZ yöntemi ile yapılarak tür ayrımı yapılmıştır.

Sıvı besiyerlerinin hazırlanması ve izolatların ekimi: Çalışmada kullanılacak olan besiyerleri RPMI 1640 (Gibco, ABD), Medium 199 (Gibco, ABD), Schneiders Medium (Sigma, ABD), Nutrient Broth (Merck, Almanya) ve Brain Heart Infusion Broth (Fluka, ABD) kullanılmadan önce hazırlanan besiyerlerine %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penicillin/streptomisin solüsyonu ve %1 gentamisin solüsyonu eklenmiştir. Yirmi beş mL'lik flasklere 5'er mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Flaskların içerisine NNN besiyerinde üremeye başlayan promastigotlardan 10^5 promastigot/mL olacak şekilde 1'er mL eklenmiştir. Ekim yapılan flaskler 25°C'lik etüvde inkübe edilmiştir (Şekil 1, 2).

Üreme yoğunluklarının değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz: Ekimleri yapılan besiyerlerinde 12 gün boyunca her gün Thoma lamı yardımıyla promastigotların üreme yoğunlukları saptanmıştır. Böylece beş farklı besiyerinde üç farklı tür olmak üzere 15 çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma grupları Sidak's Multiple Comparisons testi uygulanarak istatiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve *Leishmania* spp. suşları.



Şekil 2. *Leishmania* spp. izolatlarının besiyerlerine ekimi.

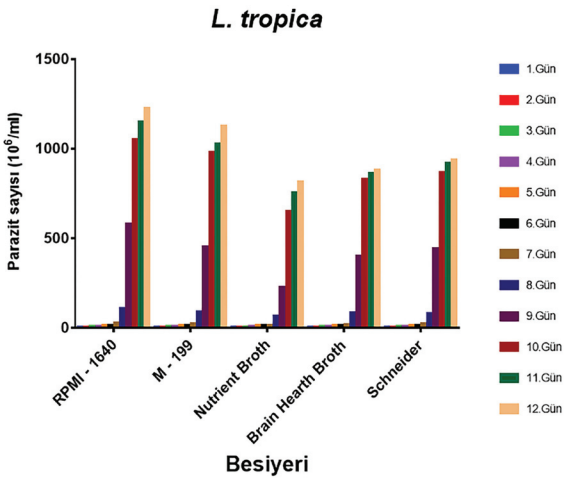
Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Yerel Etik Kurulu'nun 07/12/2016 tarih ve 20.478.486-398 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2016-165 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BULGULAR

Günümüzde en çok kullanılan besiyeri RPMI 1640 besiyeri baz alınıp *L. tropica, L. major* ve *L. infantum/donovani* için Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatiksel analiz yapıldığında aşağıdaki verilere ulaşılmıştır.

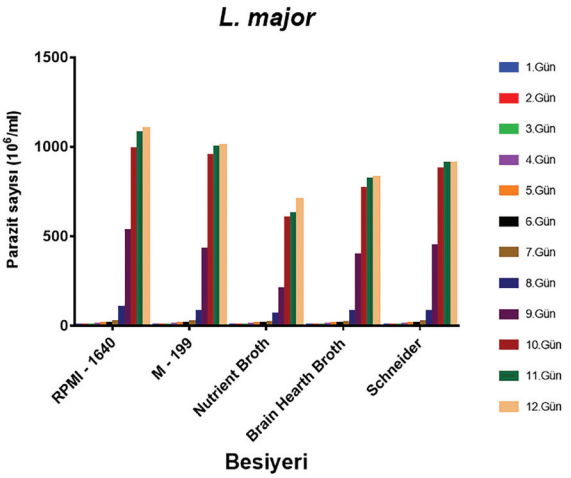
Leishmania tropica için 1. günden 6. güne kadar her dört besiyerinde üreme hızı yönünden anlamlı bir fark görülememiştir (p>0.05). Çalışmada, 7. günden itibaren ise M199, Nutrient Broth ve Brain Heart Broth besiyerlerinin üreme yoğunlukları RPMI 1640 besiyerine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p<0.05). RPMI 1640 besiyerine göre Schneiders Medium besiyerinin üreme yoğunluğunda ise anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05). Çalışmanın 8. gününden 12. gününe kadar diğer dört besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az parazit ürettiği bulunmuştur (p<0.05) (Grafik 1).



Grafik 1. *Leishmania tropica*'nın besiyerlerindeki üreme grafiği.

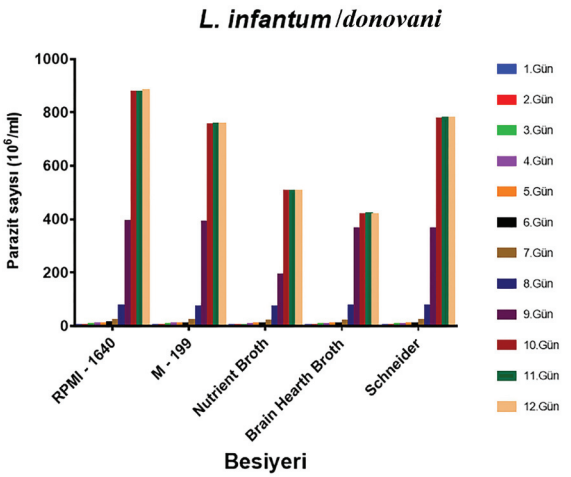
*Leishmania major'*da ise RPMI 1640 besiyeri esas alındığında ilk gün beş besiyeri arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (p>0.05). Fakat 2. günden itibaren Nutrient Broth ve Brain Heart Broth'un RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot ürettiği görülürken 3. gün ile 6. gün arasında üreme yoğunluğu farkı kapanmıştır (p>0.05). Çalışmanın 7. gününden itibaren Nutrient Broth ve Brain Heart Broth besiyerlerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot ürettiği saptanırken, 8. gün ile 12. gün arasında diğer dört besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre anlamlı olarak daha az promastigot ürettiği gözlenmiştir (p<0.05) (Grafik 2).

Leishmania infantum/donovani için ise 1. ile 5. gün arasında promastigot üremesi açısından besiyerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0.05).



Grafik 2. *Leishmania major*'ün besiyerlerindeki üreme grafiği.

Çalışmanın 6. ve 9. günlerinde Nutrient Broth, Brain Heart Broth ve Schneiders Medium besiyerleri RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot üretirken (p<0.05), M199 besiyeri ile RPMI 1640 besiyeri arasında promastigot yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p>0.05). Çalışmanın 7. gününde yalnızca Nutrient Broth besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot yoğunluğu içerdiği görülürken (p<0.05), 8. gün Nutrient Broth besiyerinin yanısıra M199 besiyerinin de RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot ürettiği saptanmıştır (p<0.05). Çalışmanın 10. ile 12. günü arasında diğer dört besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot üretebildiği gözlenmiştir (p<0.05) (Grafik 3).



Grafik 3. *Leishmania infantum/donovani*'nin besiyerlerindeki üreme grafiği.

Leishmania tropica, L. major ve *L.infantum/donovani* türleri arasında besiyerlerinde tür bazında üreme yoğunlukları farklılığı saptanamamıştır ($p>0.05$).

TARTIŞMA

İnsan-vektör-insan geçişi ile yayılmakta ve dünyada oldukça geniş bir alanda görülebilmekte olan leishmaniasisi Dünya Sağlık Örgütü'ne bildirim yapan 200 ülke bulunmaktadır. Leishmaniasis açısından endemik bölgede yaşayan 1 milyar insan risk altındadır ve birçok ekonomik ve sosyal gelişimi etkilemekte, insan yaşamını ve sağlığını tehdit etmektedir[1].

Tanıda ilk aşamayı klinik tanı oluşturmakta ve önemli bir yer tutmaktadır. KL'da ise lezyonun kenarından tüberkülin enjektörü yardımıyla alınan sıvının Giemsa, Wright veya Field gibi boyalarla boyanıp amastigotların görülmesi ile tanı konmaktadır. Leishmaniasis, 18. ve 19. yüzyıllarda bir hastalık olarak bilinmesine rağmen, 20. yüzyılın başlarına kadar tanısı konulamamıştır. Klinik tanı özellikle endemik bölgelerdeki sağlık personeli tarafından yapılabilmektedir. Kesin tanı, klinik örneklerde parazitin gösterilmesi ve/veya kültür yöntemleri kullanılarak promastigotların üretilmesi ile konur. Bu yöntemler leishmaniasis tanısında "altın standart" olarak kabul edilmiştir. Bu yüzden besiyerleri leishmaniasis tanısında önemli bir yer tutmaktadırlar.

Besiyeri çalışmalarında, birçok madde ve birçok yöntem kullanılarak hazırlanan besiyerleri *Leishmania* promastigotlarının üretilmesinde denenmiştir. Mansour ve ark.[9] tarafından 1973 yılında yapılan bir çalışmada, *Trypanasoma* üretilmesi için geliştirilmiş olan 1. solüsyonda sığır ekstresi, pepton ve agar, 2. solüsyonda defibrine tavşan kanı ilave edilen dektroz ve tamponlama tuzları içeren ve bu iki solüsyonun karıştırılması ile elde edilen National Institutes of Health (NIH) bifazik besiyerinden modifiye edilmiş yeni bir sıvı besiyeri geliştirmişlerdir. Besiyerinin 1. solüsyonunda agar kullanılmamış, ikincisinde ise sitratlı veya defibrine tavşan kanı yerine hemolize insan kanı kullanılarak modifiye edilmiştir. Hazırlaması kolay, daha az kan gerektiği bildirilen bu yeni sıvı besiyeri Tobie bifazik besiyeri ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuç alındığı rapor edilmiştir.

Evans[10] tarafından yapılan bir çalışmada, 12 farklı *Leishmania* türüne ait promastigotların %5 Evans Blood Lysate Broth Medium içeren Modified Minimal Essential Medium (MEM) ile Schneider's Medium besiyerlerindeki üreme yoğunlukları karşılaştırılmış ve Schneider's Medium besiyerinin daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir.

Limoncu ve ark.[11] tarafından 1997 yılında yapılan bir çalışmada, içeriğinde pepton ve maya ekstresi bulunan %10 FBS ilave edilmiş P-Y adı verilen sıvı besiyerinde *L. tropica* ve *L. infantum* promastigotlarının çoğalması NNN ve RPMI 1640 + %10 FBS besiyerleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve P-Y ile RPMI 1640 besiyerlerinin birbirlerine yakın sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Besiyerleri değişik çalışmalarda tanıdaki değeri için diğer yöntemlerle ve birbirleri ile karşılaştırma amacı ile kullanılmışlardır. Bates[12] tarafından yapılan bir çalışmada, %20 FBS içeren Schneiders Medium promastigotlar ekilmiş, her gün yayma yapılıp Giemsa ile boyanarak değerlendirilmiş, aynı anda biyokimyasal göstergeleri (total protein, proteinaz, nükleaz ve asit fosfataz) değerlendirmiştir. Sonuçlar amastigotların identifiye edilmesi, promastigotların çoğalması ve metasiklik promastigotları olması olarak üç ana safhanın olduğunu ve hem kültür yöntemi, hem de biyokimyasal göstergelerin takibi ile bunların başarıyla gösterilebileceği bildirilmiştir.

Nutrient Broth promastigotların üremesinde kullanılabilmektedir. Kaddu ve Nyamori[13] nutrient broth besiyerinde *L.donovani, L. major, L. adleri* ve bir kemirgen *Leishmania* türünün promastigotlarını üretmişlerdir.

Özbilgin ve ark.[14] tarafından Nutrient Broth üzerine yapılan başka bir çalışmada, biri VL, diğeri KL düşünülen 2 hastadan alınan kemik iliği örneği NNN besi-

yerine ve %20 FBS içeren Nutrient Broth besiyerine ekilmiş, Nutrient Broth besiyerinde 1. günden itibaren promastigotlar görülürken, NNN besiyerinde 2. günden sonra saptanabilmiştir. Bu da erken tanı için Nutrient Broth besiyerinin tercih edilebileceğini düşündürmektedir.

Yereli ve ark.[15] tarafından yapılan bir çalışmada, *L. infantum* ve *L. tropica* promastigotları, mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarında kolaylıkla bulunabilecek pepton A, sığır ekstresi gibi maddeler içeren %10 FBS+Nutrient Broth sıvı besiyerinde üretilmiştir. Araştırmacılar 5. günün sonunda $3x10^6$ parazit/ml oranında promastigot saptamışlardır. Ucuz, kolay hazırlanır ve kolay bulunur besiyerinin NNN bifazik besiyerine alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Balcıoğlu ve ark.[16] yaptıkları bir çalışmada, *L. infantum* ve *L. tropica* in vitro kültivasyonu için %20 FBS eklenmiş RPMI 1640 besiyerine %3 oranında steril insan idrarı eklendiğinde kontrol grubuna göre daha fazla miktarda promastigot ürediğini gözlemlemişlerdir.

Sadigursky ve Brodskyn[17] tarafından yapılan ve serum kullanılmayan bir çalışmada, karaciğer infüzyon broth+triptoz (LIT) besiyerine %1 oranında RPMI 1640+Medium 199 karışımı olan R9 eklenmiş, *L. mexicana* ve *L. donovani* promastigotları ekilerek LIT+R9, NNN, Warren besiyeri ve LIT+%5 FBS karşılaştırılmıştır. Parazitin üremesinin tüm besiyerlerinde birbirlerine yakın bulunduğu bildirilmiştir.

Ali ve ark.[18] tarafından yapılan bir çalışmada, FBS, kan veya kan ürünü içermeyen basit, ekonomik, temelinde yumurta olan bifazik besiyeri geliştirilmiştir. Sığır ekstresi ve pepton ağırlıklı zenginleştirilmiş broth ile glukoz ve L-prolin içeren tuz solüsyonu hazırlanmıştır. Bunlara taze ve tüm yumurta ilave edilmiştir. Besiyeri bifazik modifiye Tobie besiyeri+FBS, sıvı Medium 199+FBS ile karşılaştırılmış, üç besiyerinden benzer sonuçlar almışlardır.

Tayland'da yeni saptanan ve leishmaniasis etkeni olan *Leishmania martiniquensis'*in Medium 199, RPMI 1640, Grace's insect medium ve Schneider's medium'da üreme yoğunluklarının karşılaştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada, çalışmamıza paralel olarak, bilimsel çalışmalarda en fazla promastigot elde edilebilen besiyeri de RPMI 1640 medium olarak belirlenmiştir[19].

Bizim çalışmamızda da *L. tropica, L. major* ve *L. infantum/donovani* türlerinde 7. günden itibaren her beş besiyerinde de promastigotları ile çalışılabilir bir sayıya ulaştığı gözlenmiştir. *L. tropica* ($105x10^5$/ml) ve *L. major* ($101x10^5$/ml)'de 8. günden sonra özellikle RPMI 1640 besiyerinde bol miktarda üreme görülürken, *L. infantum/donovani* ($390x10^5$/ml)'de ise 9. günden sonra çalışmalarda kullanılabilecek yoğunlukta promastigot üremeleri saptanmıştır. Tüm besiyerlerinde *L. tropica, L. major* ve *L. infantum/donovani'*nin 11. günden sonra yeterli sayıda (10^7/ml'den fazla) promastigot üreterek planlanacak laboratuvar çalışmalarınında kullanılabileceği saptanmıştır. *L. tropica, L. major* ve *L. infantum/donovani* türlerinin her bir besiyerindeki promastigotlarının tür bazında üreme sayıları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak, bu veriler ışığı altında Türkiye'deki KL hastalarından elde edilen *L. tropica, L.major* ve *L. infantum/donovani* izolatlarında daha fazla bol sayıda promastigot elde etmek için öncelikle RPMI 1640 besiyerinin tercih edilmesi uygun olacağı kanısına varılmıştır. Daha sonra ise sırasıyla M199, Schneiders Medium, Brain Heart Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinin kullanılması gerekmektedir. Buradaki verilerin mikrobiyoloji bilim alanında çalışan ve *Leishmania* türleri üzerine moleküler, izoenzim, ilaç, immunoloji ve biyokimyasal konularda araştırma planlayan genç araştırmacılara çok miktarda promastigot elde etmeleri için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Bio. Yalçın Demir'in Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit

Bankası'na çalışmadaki suşların sağlanmasında sağladığı katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. WHO. 2019. Leishmaniasis. http://www.who.int/leishmaniasis/en/[Erişim tarihi: 14.11.2019]
2. Merdivenci A. Medikal Protozooloji. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1981.
3. Markell EK. Medical Parasitology. 7th. Philadelphia: W.B. Saunders Comp.; 1992.
4. Osman OF. Visseral Leishmaniasis: The PCR and DAT for diagnosis and management. 1998.
5. WHO. Information Circular. WHO Mediterranean Zoonoze Control Centre. 1996.
6. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 4. Baskı İstanbul. İstanbul: İ.Ü. Cerr. Tıp Fak. Yayınları; 1991.
7. WHO. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. 1990;793:1-158.
8. TOZ SO, Culha G, Zeyrek FY, et al. A real time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. Plos Negl Trop Dis. 2013;7(5): e2205. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205
9. Mansour NS, Hady J, McConnel E. A modified liquid medium for *Leishmania*. J Parasitol. 1973;59(6):1088-90. https://doi.org/10.2307/3278648
10. Evans DA. A inexpensive easily available replacement for foetal calf serum in media for the in vitro cultivation of *Leishmania* spp. Z Parasitenkd. 1986;72(5):567-72. https://doi.org/10.1007/BF00925475
11. Limoncu ME, Balcıoğlu İC, Yereli K, Özbel Y, Özbilgin A. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 1997;35(9):2430-1. https://doi.org/10.1128/JCM.35.9.2430-2431.1997
12. Bates PA. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. Parasitology. 1994;108(Pt 1):1-9. https://doi.org/10.1017/S0031182000078458
13. Kaddu JB, Nyamori MP. Nutrient broth for the cultivation of *Leishmania*. J Parasitol. 1990;76(2): 265-6. https://doi.org/10.2307/3283030
14. Özbilgin A, Özbel Y, Alkan MZ, Atambay M, Özcel MA. Cultivation of *Leishmania* sp. in nutrient broth. J Egypt Soc Parasitol. 1995;25(2):437-41.
15. Yereli K, Girginkardeşler N, Değerli K, Özbilgin A. A simple method for the cultivation of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* strains in nutrient broth. Turkiye Parazitol Derg. 1997;21(1):111-3.
16. Balcıoğlu İC, Girginkardeşler N, Yereli K, Özbel Y, Özbilgin A. Ülkemizde izole edilen *Leishmania infantum* ve *Leishmania tropica*'nın in vitro üretilmesi üzerine insan idrarının etkisi. Turkiye Parazitol Derg. 1997;21(2): 119-21.
17. Sadigursky M, Brodskyn C. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. Am J Trop Med Hyg. 1986;35(5):942-4. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.942
18. Ali SA, Khalil NY, Iqbal J, Yasinzai MM. In vitro maintenance of *Leishmania* promastigote in an egg based biphasic culture medium. Methods Cell Sci. 1997;19:107-10. https://doi.org/10.1023/A:1009786915090
19. Siripattanapipong S, Boontanom P, Leelayoova S, Mungthin M, Tan-Ariya P. In vitro growth characteristics and morphological differentiation of *Leishmania* martiniquensis promastigotes in different culture media. Acta Trop. 2019;197:105039. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.030

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):56-62
doi:10.5222/TMCD.2020.056

Araştırma / *Research Article*

Leishmania spp., *Plasmodium* spp. ve *Toxoplasma gondii'*nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi ile Tanısı: Limit Saptama Pilot Çalışması

Identification of Leishmania spp., Plasmodium spp. and Toxoplasma gondii with Polymerase Chain Reaction: A Pilot Study for Limit Determination

Tuba Oyur*, Özgür Kurt, İbrahim Çavuş*, Ahmet Özbilgin***

*Manisa Celal Bayar Tıp Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa
**Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZ

Amaç: *Kan ve dokularda yerleşen paraziter hastalıklar insan sağlığı için dünya çapında büyük tehlike oluşturmaktadır. Sıtma, leishmaniasis ve toksoplazmoz her yıl çok sayıda kişinin yaşamını kaybetmesine neden olmakta, tedavi maliyetleri ve iş gücü kaybı nedeniyle ülke ekonomilerine büyük yük getirmektedir. Bu çalışmada, Plasmodium spp., Leishmania spp. ve Toxoplasma gondii'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) ile klinik örneğin mikrolitresinde belirlenebilecek en düşük parazit sayısının belirlenmesi, test validasyonlarının yapılması ve GZ-PZR testinin rutin laboratuvarlara dâhil edilmesi amaçlanmıştır.*

Yöntem: *Leishmania tropica (promastigot ve amastigot), L. infantum (promastigot ve amastigot), T. gondii Thoma lamı ile mikroskop altında sayılarak P. falciparum ve P. vivax ise yayma preparatlar hazırlanıp Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelenerek parazitemi yoğunluğu saptanmıştır. Daha sonra bu parazitlerin PBS solüsyonu ile mikrolitrede 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 ve 10.000 parazit olacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır. Tüm parazit süspansiyonlarından DNA izolasyonu yapılarak GZ-PZR ile pozitif sonuç alınan en düşük parazit süspansiyonu belirlenmiştir. Daha sonra da negatif sonuç alınan süspansiyon ile bir önceki pozitif süspansiyon arası yine dilüsyon yapılarak testin saptayabildiği en düşük parazit sayısı belirlenmiştir.*

Bulgular: *GZ-PZR testinde P. falciparum ile L. tropica ve L. infantum'un promastigot ve amastigot formlarında en düşük parazit sayısı 10, P. vivax ve T. gondii parazitlerinde ise 12 olarak bulunmuştur.*

Tartışma: *Leishmania spp., Plasmodium spp. ve T. gondii'nin GZ-PZR ile tanısında çok düşük sayıdaki parazitlerin başarı ile saptanması, bu testin her üç parazitin moleküler tanısında güvenle kullanılabileceğini düşündürmüştür.*

Anahtar kelimeler: *GZ-PZR, Leishmania spp., Plasmodium spp., Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

Objective: *Parasitic diseases that involve blood and tissues pose a significant threat to human health worldwide. Malaria, leishmaniasis and toxoplasmosis kill thousands of people worldwide annually, and impose a great burden on national economies due to treatment costs and loss of labour. The aim of this study are to determine the lowest number of parasites detectable by Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Plasmodium spp., Leishmania spp. and T. gondii and to validate the RT-PCR test, and integrate RT-PCR in routine laboratories applications.*

Methods: *Leishmania tropica (both promastigotes and amastigotes), L. infantum (both promastigotes and amastigotes) and T. gondii were counted using a hemocytometer, while Giemsa-stained smears of P. falciparum and P. vivax were examined under the microscope to define their parasitic load. Then, dilutions as 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 and 10.000 parasites/ul were prepared in PBS solutions. DNA isolation was performed from all parasite suspensions and the lowest parasite suspension which was positively detected by RT-PCR method was identified. This was followed by further dilutions between the previous negative and last positive dilutions, to further determine the lowest number of parasites that RT-PCR could eventually identify.*

Results: *Our assessments showed that the lowest number of parasites necessary for positive RT-PCR were 10 for P. falciparum and amastigotes and promastigote forms of L. tropica/L. infantum, while 12 for P. vivax and T. gondii.*

Conclusion: *These results show that RT-PCR is a reliable diagnostic option to be used successfully for the detection of Leishmania spp., Plasmodium spp. and T. gondii, even for infections with low parasitemia.*

Keywords: *Leishmania spp., Plasmodium spp., Toxoplasma gondii, RT-PCR*

Alındığı tarih / Received:
18.11.2019 / 18.November.2019

Kabul tarihi / Accepted:
02.12.2019 / 02.December.2019

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCİD Kayıtları

T. Oyur 0000-0001-8014-284X
Ö. Kurt 0000-0001-5575-588X
İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ icvs26@yahoo.com

Atıf: Oyur T, Kurt Ö, Çavuş İ, Özbilgin A. Leishmania spp., Plasmodium spp. ve Toxoplasma gondii'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi ile Tanısı: Limit Saptama Pilot Çalışması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):56-62.

© 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.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü tarafından altı önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen ve dünyada her yıl tahminen 1.3 milyon yeni olgu ve 200-300 bin kişinin ölümüne yol açtığı sanılan önemli bir enfeksiyondur. *Leishmania* türleri memelilerin zorunlu hücre içi paraziti olup, enfekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar (yakarca) tarafından kan emme sırasında bulaştırılmaktadır[1,2]. Sıtma, leishmaniasis ve toksoplazmoz tüm dünyada insan sağlığını etkileyen önde gelen paraziter hastalıklar arasındadır. Yapılan araştırmalar, dünyada her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin ve her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle yaşamını kaybettiğini; dünya nüfusunun %40'ının sıtma riski altında olduğunu ve her yıl 300-350 milyon insanın enfeksiyonu aldığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, özellikle immünsüpresif hastalar ile gebeler için ciddi bir sağlık tehdidi olan toksoplazmoza dünya nüfusunun %13'ünde rastlanılmaktadır[3-6].

Bu üç parazitin neden olduğu enfeksiyonun tanı yöntemleri incelendiğinde, deri leishmaniasis'inde sağlam deri ile lezyonun birleştiği bölgeden iğne aspirasyonu ile alınan materyalin, viseral *leishmaniasis* (VL) hastalarında ise dalak veya kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan yayma preparatlarının, Wright veya Giemsa boyama yöntemi ile boyanarak amastigotların görülmesi veya bu materyallerin NNN besiyerine ekilerek promastigotların üretilmesiyle tanı konulması altın standarttır[1,7]. Sıtmada ise altın standart parmak ucundan alınan kandan ince yayma ve kalın damla preparatları hazırlanarak parazitin mikroskopta görülmesidir. Toksoplazmoz için seroloji en çok tercih edilen tanı yöntemidir. Bununla birlikte, özellikle serolojik sonuçların şüpheli olarak saptandığı gebelerde amniyon sıvısından yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) güvenle kullanılmaktadır[8-11].

Paraziter hastalıkların tanısında mikroskobik incelemeden serolojiye, kültürden PZR'ye çok sayıda farklı yöntem kullanılmaktadır[12]. Son yıllarda mikrobiyolojinin çoğu alanında olduğu gibi parazitolojide de PZR gibi moleküler tanı yöntemleri yaygın olarak tercih edilmeye başlanmıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında PZR'nin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü, hastalara hızlı sonuç verilebilmesi ve az miktarda örnekle dahi iyi sonuç alınabilmesi sayılabilir. Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkeler için PZR halen diğer yöntemlerden daha pahalıdır. Ayrıca PZR'nin özel bir laboratuvar, cihazlar ve özel eğitimli personel gerektirmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Bu çalışmada, *Plasmodium spp., Leishmania spp.* ve *T. gondii*'nin gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) tepkimesi ile klinik örneğin mikrolitresinde belirlenebilecek en düşük parazit sayısının belirlenmesi, test validasyonlarının yapılması ve GZ-PZR testinin rutin laboratuvarlara dâhil edilmesi sırasında yardımcı olması amaçlanmıştır. Bu çalışmayla oluşturulacak standartlar ile gelecekte patentli bir tanı kiti geliştirilmesi hedeflenmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Parazit süspansiyonlarının hazırlanması: Çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı'nda, sıvı azot içinde saklanmakta olan parazit suşları kullanılmıştır. *Leishmania tropica* (promastigot ve amastigot), *Leishmania infantum* (promastigot ve amastigot), *Toxoplasma gondii* Thoma lamı ile mikroskop altında sayılarak *Plasmodium falciparum* ve *Plasmodium vivax* ise yayma preparatlar hazırlanıp Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelenerek parazitemi yoğunluğu saptanmıştır. Daha sonra bu parazitler PBS solüsyonu ile mikrolitrede 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 ve 10.000 parazit olacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır. Pozitif çıkan son dilüsyon ile ondan sonraki ilk negatif çıkan dilüsyon arası yine dilüsyon yapılarak çalışılmıştır. Tüm çalışmalar 3 kez tekrarlanmış ve çıkan sonuçların ortalaması alınmıştır.

DNA izolasyonu: Hazırlanan her bir parazit süspansiyonundan DNA izolasyonu ticari kit (High Pure PCR template preparation kit, Roche) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

GZ-PZR: Her bir parazit için kullanılan primer ve problar Tablo 1'de verilmiştir. GZ-PZR analizinde her bir parazit için "PCR grade" su, ileri ve geri yönlü primerler, problar ve QuantiTect Probe PCR Master kit (Qiagen) içeren reaksiyon karışımından 20 µl ve 5 µl genomik DNA kullanılmıştır. PZR karışımları 0.2 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde hazırlandıktan sonra GZ-PZR cihazında çalışılmıştır.

Tablo 1. GZ-PZR için kullanılan primer ve problar.

Parazit	Primer-Prob	Kaynak
L. tropica *L.infantum*	FP: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' RP: 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' P1: 5'-CCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTT TCGGTTT-Fluo-3' P2: 5'-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGT GTG-Pho-3'	13
P. falciparum *P. vivax*	FP: 5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA-3' RP: 5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3' P: 5'-6FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAA AGATGACT-TMR (Pf) P: 5'-6FAM-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGA AGAGAAAATTCT-TMR (Pv)	14
T. gondii	FP: 5'-CTCGCCTGTGCTTGGAGC-3' RP: 5'-CCTCGCCTTCATCTACAGTCCT-3' P: 5'-6FAM-TCTGTAGTCCCCTTCGACTTCTG TCCC-BHQ1	15

FP: Forwardprimer, RP: Reverseprimer, P:Prob, ITS: Internal transcribed spacer-1, Pf: P. falciparum, Pv: P. vivax

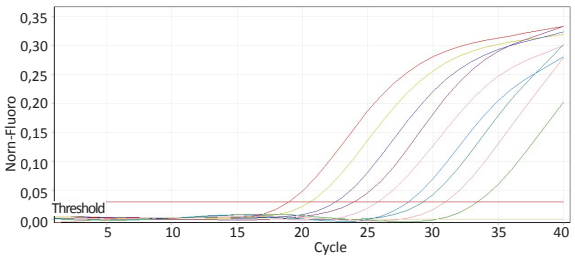
Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015-090 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BULGULAR

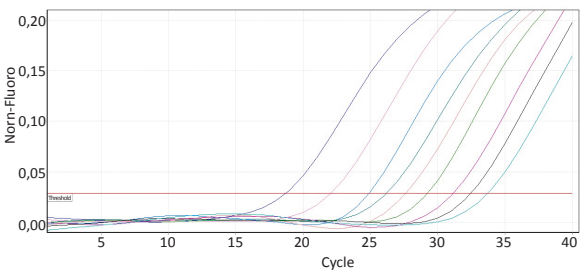
Yapılan GZ-PZR testinde *P. falciparum, L. tropica* (promastigot), *L. infantum* (promastigot), *L. tropica* (amastigot), *L. infantum* (amastigot) parazitlerinde en düşük parazit sayısı mililitrede 10 olarak bulunurken, *P. vivax* ve *T. gondii* içinse 12 olarak saptanmıştır (Tablo 2) (Şekil 1-3).

Tablo 2. Parazit türlerine göre GZ-PZR saptanan en düşük parazit sayısı.

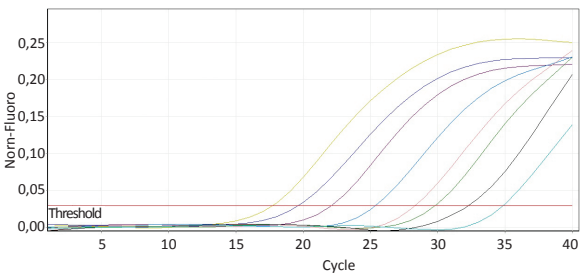
Parazit Türü	GZ-PZR Saptanan En Düşük Parazit Sayısı (parazit/ml)
Plasmodium falciparum	10
Plasmodium vivax	12
Leishmania tropica (promastigot)	10
Leishmania infantum (promastigot)	10
Leishmania tropica (amastigot)	10
Leishmania infantum (amastigot)	10
Toxoplasma gondii	12



Şekil 1. *Leishmania tropica* GZ-PRZ analizi.



Şekil 2. *Plasmodium falciparum* GZ-PRZ analizi.



Şekil 3. *Toxoplasma gondii* GZ-PRZ analizi.

TARTIŞMA

Paraziter hastalıkların tanısında farklı duyarlılığa ve özgüllüğe sahip birçok yöntem kullanılmakta, her biri için tanıda altın standart farklılık gösterebilmektedir. Çoğu bakteri ve virüs enfeksiyonunda PZR rutin tanıda kullanılmaktayken, paraziter hastalıklara yönelik PZR uygulamaları daha geç başlamıştır. Yapılan çalışmalarda, PZR'nin tanısal duyarlılığının hafif enfeksiyonlu olguların tanısında çok etkili olduğu, diğer yöntemlerle saptanamayan birçok etkenin PZR ile saptandığı bilinmektedir. Buna en iyi örneklerden biri *Dientamoeba fragilis* isimli bağırsak protozoonudur. Trikrom boyalı preparatlar ile kültür yönteminin kullanıldığı özel bir çalışmada, insidansı %5'in altında saptanan bu protozoonun PZR ile üstelik Danimarka

gibi genel olarak intestinal parazitlerin insidansının düşük olduğu bir ülkede dahi %43 olarak saptanması dikkat çekici bulunmuştur[16].

Leishmaniasis olgularını tanımlamada PZR protokolleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu protokoller arasında kinetoplast DNA'sı (kDNA), ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesi (ssRNA) ve ITS-1 bölgesine yönelik olanlar en sık kullanılanlardır[17]. Özellikle öldürücü olabilen VL olgularında, hızlı ve etkin tanı olanağı sunan, hatta semptomsuz olguların bile saptanmasına olanak sağlayan bu yöntemler ile düşük parazit sayısına sahip olgularda dahi tanı konulabildiği bildirilmektedir[18]. VL'nin yaygın görüldüğü bir Afrika ülkesi olan Etiyopya'da yapılan bir çalışmada, VL'nin tanısı için en duyarlı yöntemin kDNA'ya yönelik GZ-PZR protokolü olduğu ve testin saptama eşiğinin mililitrede 10 parazit olduğu bildirilmiştir[17]. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında, *Leishmania* belirleme sınırının uyguladığımız PZR protokolü ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Yapılan farklı bir çalışmada Ceccarelli ve ark.[19] kDNA'yı hedef alarak uyguladıkları kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde, *L. amazonensis* DNA'sını 1 ile 1x10-4 aralığında dilüe ederek belirlenebilir en düşük DNA miktarını 0.1 pg olarak bulmuş ve bu miktarın 1.3 parazite eşit olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık, Eberhardt ve ark.[20] yaptıkları bir çalışmada, *L. infantum* ile enfekte edilmiş hamster organlarındaki amastigot belirleme sınırlarını, yeni geliştirdikleri RNA tabanlı ve Spliced-leader RNA saptama metodu olarak adlandırılan yöntem ile araştırmışlardır. Bu çalışmada araştırıcılar, hamster karaciğer ve dalaklarındaki amastigot miktarlarını sırasıyla 0.005 ve 0.002 parazit/mg olarak saptamışlar ve bu yöntemin 18sRNA ve kDNA bölgelerini hedefleyen yöntemlerden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir[20].

Sıtmanın tanısında tüm dünyada en yaygın kullanılan yöntem mikroskopidir. Son yıllarda moleküler yöntemlerin sıtma tanısında da yaygın olarak kullanıma girmesiyle sıtma tanısında daha etkili tanı yöntemleri uygulandığı görülmektedir. Sonuç olarak, yakın zamana kadar insanı enfekte eden dört *Plasmodium spp.* olduğu bildirilirken *P. knowlesi*'nin de insanları enfekte ettiği son yıllarda gerçekleştirilen DNA dizi analizi çalışmalarıyla ortaya konulmuştur[21,22]. Sıtmanın PZR ile tanısında, diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi parazitin DNA'sı araştırıldığından canlı/ölü parazit ayrımı yapılamamaktadır ki bu durum, PZR'nin en önemli dezavantajlarından biri kabul edilir. Bununla birlikte, Jarra ve Snounou[23] 1998 yılında yayımlanan çalışmalarında, yalnızca canlı parazitleri saptayan bir PZR protokolü tanımlamışlardır. Aynı anda tüm sıtma türlerinin birlikte araştırılabildiği bir GZ-PZR panelinde birden fazla etkenin yol açtığı sıtma enfeksiyonları da belirlenebilmektedir. Sonuç olarak, deneysel çalışmalarla sıtma tanısında PZR duyarlılığındaki alt limitin 5-10 yeni izole edilmiş sporozoit olduğu bildirilmektedir[24]. Imwong ve ark.[25] yaptığı bir çalışmada, sıtma tanısında kullanılan PZR'nin µl'de en az 22 parazit olduğunda pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda saptadığımız alt limit olan en az 12 parazit bu bakımdan başarılı bir sonuç olarak kabul edilebilir. Hızla gelişen teknoloji ve parazit genomunda daha duyarlı yeni hedef bölgelerin saptanması ile belirleme limitleri oldukça aşağı çekilmiştir. Raju ve ark.[26] sıtmanın moleküler tanısında "identical multirepeat sequences" (IMRSs) olarak adlandırılan bir dizi özdeş hedef bölgenin primer potansiyelini araştırmış ve bu bölgeye özgü primerlerin 18sRNA gen bölgesine göre tasarlanan primerlerden 100 kat daha düşük miktarda paraziti saptayabildiğini göstermişlerdir. Yine Almeida-de-Oliveira ve ark.[27] tarafından yapılan bir çalışmada, SYBR™ ve TaqMan™ prob sistemleri kullanılarak uygulanan GZ-PZR yönteminde *P. vivax* için limit saptama performansı 0.01 parazit/µl olarak bulunmuştur.

Toksoplazmoz için uygulanan diğer tanı seçeneklerine kıyasla çok daha etkin, hızlı ve kontaminasyon riski düşük bir yöntem olan GZ-PZR ile yalnızca kandan değil, her türlü vücut sıvısı ve doku örneğinde de *T. gondii* DNA'sı aranabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, incelenen örnekte az sayıda *T. gondii* takizoiti bulunduğunda dahi sonuç alınabildiği gösterilmektedir. Günümüzde özellikle gebelerde toksoplazmoz kuşkusu duyulduğunda amniyon sıvı örneğinden

yapılan GZ-PZR, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü ile güvenle kullanılmaktadır[28,29]. Parazit yükünün az olduğu olgularda erken dönemde tanı koymak özellikle gebelerde önemli olduğundan, geliştirilen testlerde olabildiği kadar az sayıda parazitin varlığında pozitif sonuç veren protokoller değer kazanmıştır. Özellikle Fransa'da yapılan çok sayıda çalışma ile bugün amniyon sıvısından alınan örnekte tek bir *T. gondii* takizoiti olsa bile pozitif sonuç veren ve bu sayede doğru tanı koyduran PZR ve GZ-PZR protokolleri bulunmaktadır[28,29]. Ayrıca, deneysel olarak dokulardan alınan örneklerde *T. gondii* varlığını saptayan PZR protokolleri de geliştirilmiştir[30]. Ender görülse de ciddi sorunlar doğuran organ nakliyle bulaşan toksoplazmoz gibi olgularda bu tip testler büyük yarar sağlayacaktır. Çalışmamızda, 12 parazit/ml PZR protokolümüzün alt sınırı olarak belirlendi. Yapılan az sayıdaki benzer çalışmalardan birinde, Japon araştırmacı Asai[31], Toksoplazma ensefaliti tanısında PZR'nin etkinliğini araştırmış ve $1x10^{-8}$ ng/ul olduğunu belirtmiştir. Kedi dışkısındaki ookistleri saptayabilmek için geliştirilmiş ticari tanı kitlerinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise, en duyarlı kitin 1 gram dışkıda 50 ookist olduğunda tanı koyabildiği belirlenmiştir[32]. Farklı bir çalışmada ise, Escotte Binet ve ark.[33] toprak örneklerinde *T. gondii* ookistlerini PZR ile hızlı ve duyarlı bir yöntemle araştırmış ve minimum ookist saptama limitini 1 ookist/g olarak bildirmişlerdir. Sroka ve ark.[34] ise *T. gondii* ookistlerinin belirlenmesinde GZ-PZR ile çift türlü polimeraz zincir reaksiyonu (ÇT-PZR-nested PCR) yöntemlerini kıyaslayarak minimum ookist saptama limitini araştırmışlardır. Bu çalışmada, ookist içeren su ve kedi dışkısı örnekleri hem GZ-PZR ile hem de ÇT-PZR yöntemleri ile çalışılmıştır. Minimum ookist limitleri, su örneklerinde GZ-PZR ve ÇT-PZR için sırasıyla 1-50 ve 2-20 ookist olarak belirlenirken, dışkı örnekleri için ise 1-50 ve 50 ookist olarak bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, Rahimi Esboei ve ark.[35] oküler toksoplazmozlu hastaların kan örneklerinde *T. gondii* belirlenmesi için RE ve B1 genlerini hedefleyerek minimum belirlenme limitini sırasıyla bir takizoit ve beş takizoit olarak saptamışlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin diğer çalışmaların verileri ile kıyaslanabilir olduğu düşünülmektedir.

Türkiye, coğrafi konumu gereği Asya, Afrika ve Avrupa arasında bir geçiş noktası olduğundan ülkemizdeki parazit suşlarının ileri derecede çeşitliliğe sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışma ile *P. falciparum* dışında ülkemizden elde edilen yerli parazit suşlarından *L. tropica, L. infantum, T. gondii* ve *P. vivax* (ülkemizdeki sıtma eliminasyonundan önce elde edilmiş) ile PZR denemeleri yapılıp uygun test koşulları için pozitiflik limitleri ilk kez ortaya konulmuştur. İçeriği ve sonuçları göz önüne alındığında bu çalışma özgündür ve ülkemizdeki çalışmalara katkı sağlayacağı ve rehber olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın verileri ile yapılacak sonraki ve ileri çalışmalar ülkemizde bu üç parazit hastalığının tanısı için uygulanacak PZR testlerinin duyarlılık ve özgünlüğünün geliştirilmesine katkı sağlayacak, ülkemize özgü izolatlar ile hazırlanacak tanı kitleriyle bu konudaki dışa bağımlılığı da azaltabilecektir. Bu bilgilerin ışığında daha fazla sayıda örnek ve ileri çalışmalar ile çalışmada araştırılan parazitlerin GZ-PZR ile saptanmasına yönelik yerli tanı kitlerinin geliştirilmesi ve patent alınması da planlanmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Bio. Tuba Oyur'un Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'na çalışmadaki suşların temin edilmesinde sağladığı katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Özbel Y, Özensoy TS. Leishmaniasis. İçinde: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (Eds). Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007:22:197-241.
2. WHO. Leishmaniasis. 2019. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en [Erişim tarihi:10.10.2019]
3. Özcel MA. Sıtma Epidemiyolojisi. İçinde: Özcel MA (Eds). Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007;22:79-140.
4. WHO. World Malaria Report: WHO and UNICEF. 2005. http://www.rbm.who.int/wmr [Erişim tarihi:10.03.2011]
5. Özcel MA. Sıtma. İçinde: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (Eds). Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007; No: 22;79-138.
6. Remington JS, McLeod R, Desmonts G. Toksoplazmosis. In: Infectious Diseases of the Fetus & Newborn Infant. 4th Ed. Remington&Klein. WB Saunders Company,

1992:5:140-267.
7. Novy FG, MacNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei.* J Infect Dis. 1904;1:1-30. https://doi.org/10.1093/infdis/1.1.1
8. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Sıtma. Tıp Parazitolojisi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1995:623-64.
9. Gürüz Y, Korkmaz M. Özellikli tanı yöntemleri. İçinde: Özcel MA, Altıntaş N (Eds). Parazit Hastalıklarında Tanı. İzmir: Parazitoloji Derneği Yayını, No:15. 1997:293-318.
10. Montaya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002;185(Suppl 1):S873-82. https://doi.org/10.1086/338827
11. Romand S, Chosson M, Franck J et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. Am J Obstet Gynecol. 2004;190(3):797-802. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.09.039
12. Daldal N, Özensoy S, Aksoy Ü, Akısü Ç. 1999. Besiyerleri ve Hayvan İnokülasyonları. İçinde: Özcel MA, Altıntaş N. (Eds). Parazit Hastalıklarında Tanı. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No:15. 1999:149-82.
13. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(5):e2205. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205
14. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5636-43. https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004
15. Selseleh M, Modarressi MH, Mohebali M et al. Real-time RT-PCR on SAG1 and BAG1 gene expression during stage conversion in immunosuppressed mice infected with *Toxoplasma gondii* Tehran strain. Korean J Parasitol. 2012;50(3):199-205. https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.3.199
16. Röser D, Simonsen J, Nielsen HV, Stensvold CR, Mølbak K. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32(10):1303-10. https://doi.org/10.1007/s10096-013-1880-2
17. Abbasi I, Aramin S, Hailu A et al. Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania* donovani DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. BMC Infect Dis. 2013;27:13:153. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-153.
18. Mary C, Faraut F, Drogoul MP, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. Am J Trop Med Hyg. 2006;75(5):858-63. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.858
19. Ceccarelli M, Galluzzi L, Diotallevi A, et al. The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between *Leishmania* (L.) *infantum* and *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Parasit Vectors. 2017;10(1):239. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2181-x
20. Eberhardt E, Van den Kerkhof M, Bulté D, et al. Evaluation of a pan-*Leishmania* spliced-leader RNA detection method in human blood and experimentally infected Syrian golden hamsters. J Mol Diagn. 2018;20(2):253-63. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.12.003
21. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis. 2008;46(2):172-3. https://doi.org/10.1086/524889
22. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Gündüz C. Türkiye'deki ilk maymun sıtması: Bir *Plasmodium knowlesi* olgusu. Mikrobiyol Bul. 2016;50(3):484-90. https://doi.org/10.5578/mb.27788
23. Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. Infect Immun. 1998;66(8):3783-7.
24. Schussek S, Groves PL, Apte SH, Doolan DL. Highly sensitive quantitative real-time PCR for the detection of *Plasmodium* liver-stage parasite burden following low-dose sporozoite challenge. PLoS One. 2013;8(10):77811. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077811
25. Imwong M, Stepniewska K, Tripura R et al. Numerical distributions of parasite densities during asymptomatic malaria. J Infect Dis. 2016;213(8):1322-9. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv596
26. Raju LS, Kamath S, Shetty MC, et al. Genome mining-based identification of identical multirepeat sequences in *Plasmodium falciparum* genome for highly sensitive real-time quantitative PCR assay and its application in malaria diagnosis. J Mol Diagn. 2019;21(5):824-38. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.04.004
27. Almeida-de-Oliveira NK, Moreira OC, de Lavigne AR, et al. Analytical validation of real-time quantitative PCR assays for optimum diagnosis of vivax malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2019;114:e180350. https://doi.org/10.1590/0074-02760180350
28. Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK. Development of a real-time PCR assay for detection of

Toxoplasma gondii in pig and mouse tissues. J Clin Microbiol. 2001;39(6):2065-71. https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2065-2071.2001

29. Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. Parasitol Res. 2007;101(3):619-25. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0524-9
30. Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Sung RT. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. J Med Microbiol. 2002;51(10):871-8. https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-871
31. Asai T. The diagnosis of toxoplasmic encephalitis by polymerase chain reaction. Rinsho Shinkeigaku. 2013;23(11):1194-5. https://doi.org/10.5692/clinicalneurol.53.1194
32. Herrmann DC, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, Schares G. Comparison of different commercial DNA extraction kits to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2011;124(11-12):497-502.
33. Escotte-Binet S, Da Silva AM, Cancès B, et al. A rapid and sensitive method to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in soil samples. Vet Parasitol. 2019;274:108904. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.07.012
34. Sroka J, Karamon J, Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A, Cencek T. Optimization of flotation, DNA extraction and PCR methods for detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. Ann Agric Environ Med. 2018;25(4):680-685. https://doi.org/10.26444/aaem/97402
35. Rahimi Esboei B, Kazemi B, Zarei M, et al. Evaluation of RE and B1 genes as targets for detection of *Toxoplasma gondii* by nested PCR in blood samples of patients with ocular toxoplasmosis. Acta Parasitol. 2019;64(2):384-9. https://doi.org/10.2478/s11686-019-00056-6

YAZARLARA BİLGİ

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

Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. 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 sisteme yüklenmesi 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 sisteme yüklenmesi ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.

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

Metin Çeşitleri

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

Metin yazımı esnasında uyulacak kurallar

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

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

Örnekler

A. Makaleler

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

- Standart Dergi Makalesi: Standart Dergi Makalesi: Courvalin P, Davies J. Mechanisms of resistance to aminoglycosides. Am J Med. 1977;62(6):868-72. https://doi.org/:.....
- Dergi Ekinde (Supplement) yer alan makale: Snydman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. Chest. 2003;123(Suppl 5):S500-3. https://doi.org/:.....
- 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.. https://doi.org/:.....

B. Kitaplar

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

C. Sanal Ortam

- Web sitesi: World Health Organization. Global strategy for. Geneva: World Health Organization. 2001 [http://www.who.intemational]. (Erişim tarihi: ……).

Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

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

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