

Cilt / Volume 51
Sayı / Number 1
Mart / March 2021

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516



Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✓ **Bebek ve Küçük Çocuk Gıdalarında Bakteriyel Sağlık Riskleri**
- ✓ **Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Türlerinin Eşey Tipi (MTL) Genotiplerinin Belirlenmesi**
- ✓ ***Staphylococcus aureus*'un On Beş Yılda Metisilin Direnç ve Antibiyogram Direnç Profilinin ve Görülme Sıklığının Değişimi**
- ✓ ***Bacterioides fragilis* Grubu İzolatların Klindamisin, Tetrasiklin ve Tigesikline Duyarlılıkları ve Dirençten Sorumlu *test* ve *ermF* Genlerini Barındırma Durumları**
- ✓ **Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Hastanemizde Yayılımı: Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişkinin Araştırılması**

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY



Cilt / Volume 51

Sayı / Number 1

Mart / March 2021



TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 51 Sayı / Number 1 Mart / March 2021

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, İstanbul
0000-0002-0552-1337

Nilay Çöplü; Kastamonu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu
0000-0003-1956-1417

Ebru Evren; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0001-7615-0521

Bedia Dinç; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
0000-0001-8318-2556

Ramazan Gümrâl; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0002-2303-8234

Derya Dirim Erdoğan; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0001-6927-9917

Özgür Kurt; Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0002-5584-517X

Gürhan Çiftçiöğlü; İstanbul Kültür Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul
0000-0001-6927-9917

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

Orcid no: 0000-0001-7783-8723

Tel: 0258 296 24 91

e-posta: tmceditor@gmail.com

www.tmc-online.org

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

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

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

Yayın Türü: Yerel Süreli

Basım Yeri / Printed by

LOGOS YAYINCILIK TİC. A.Ş.

Yıldız Posta Cad. Sinan Apt. No. 36 D. 63/64

34349 Gayrettepe-İstanbul



Tel: (0212) 288 05 41

Faks: (0212) 211 61 85

mail: logos@logos.com.tr

web: www.logosyayincilik.com

Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

Rıza Adaleti, SBÜ Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul
0000-0001-9576-6794

Sinem Akçalı, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
0000-0001-7783-8723

Altan Aksoy, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
0000-0001-7939-3481

Mustafa Altay Atalay, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri
0000-0003-4169-0637

Gülşen Merve Bayrakal, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0002-2015-7182

Nural Cevahir, Ankara Yıldırım Beyazıt Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0001-8764-770

Füsun Cömert, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak
0000-0003-0161-6897

Ahmet Çalışkan, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli
0000-0002-1156-3787

Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun
0000-0002-9251-1953

Yeliz Çetinkol, Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ordu
0000-0003-4940-4498

Çandan Çiçek, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-3486-8305

Mehmet Ziya Doymaz, Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0003-2066-0252

Gülfem Ece, İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0003-4869-8199

Beyza Ener, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa
0000-0002-4803-8206

Sevgi Ergin, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0003-4519-6847

Gülşen Hazırolan, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0003-4546-9729

Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0003-0961-7325

Engin Kaplan, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Zonguldak
0000-0001-5705-717X

Bekir Sami Kocazeybek, İstanbul Üniversitesi-
Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul
0000-0003-1072-3846

Esra Koçoğlu, İstanbul Medeniyet Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul
0000-0002-2860-1794

Mert Ahmet Kuşkucu, İstanbul Üniversitesi-
Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul
0000-0001-8735-5725

Dilek Yeşim Metin, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-7282-5031

Barış Otlu, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
0000-0002-6220-0521

Sine Özmen Toğay, Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimleri Anabilim Dalı, Bursa
0000-0002-8851-1803

Mustafa Özyurt, Demiroğlu Bilim Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul
0000-0002-6867-0073

Murat Telli, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın
0000-0003-2648-881X

Nursen Topçuoğlu, İstanbul Üniversitesi,
Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri
Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0002-5041-1129

Aynur Topkaya, Yeditepe Üniversitesi, Koşuyolu
İhtisas Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
İstanbul
0000-0001-8781-1401

Meltem Yalınay, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0002-9815-8230



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

DERLEME / REVIEW

- **Bebek ve Küçük Çocuk Gıdalarında Bakteriyel Sağlık Riskleri**
Bacterial Health Risks in the Food of the Infants and Young Children
Emine GENÇ, Aydın VURAL **1-10**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS

- **Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Türlerinin Eşey Tipi (MTL) Genotiplerinin Belirlenmesi**
Identification of The Mating Type (MTL) Genotypes of Clinical Candida parapsilosis Complex Species isolated from Blood Cultures
Banu METİN, Melike YAŞAR, Aylin DÖĞEN, Süleyha HİLMİOĞLU POLAT, Macit İLKİT **11-14**
- ***Staphylococcus aureus*'un On Beş Yılda Metisilin Direnç ve Antibiyogram Direnç Profilinin ve Görülme Sıklığının Değişimi**
Change of the Frequency of Meticillin Resistance and Antibiogram Resistance Profile of Staphylococcus aureus Within a Period of 15 Years
Kamuran ŞANLI, Selen Zeliha MART KÖMÜRCÜ, Nilgün KANSAK, Rıza ADALETİ **15-22**
- ***Bacteroides fragilis* Grubu İzolatların Klindamisin, Tetrasiklin ve Tigesikline Duyarlılıkları ve Dirençten Sorumlu *tet* ve *ermF* Genlerini Barındırma Durumları**
Antimicrobial Susceptibility of Bacteroides fragilis Group Isolates to Clindamycin, Tetracycline and Tigecycline, and Their Possession of tet and ermF Genes, which are Responsible for Resistance
Bermal TEKEŞ, Semra EMİNOĞLU, Elvan SAYIN, Nurver ÜLGER TOPRAK **23-32**
- **Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Hastanemizde Yayılımı: Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişkinin Araştırılması**
Spread of Carbapenemase Producing Klebsiella pneumoniae Isolates in Our Hospital: Investigation of Molecular Typing and Clonal Relationship
Reyhan YİŞ, Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ, Ayşe Nur SARI, Zeynep GÜLAY **33-41**
- **Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Çocuklarda Solunum Sinsityal Virüsünün Saptanması ve Moleküler Analizi**
Identification and Molecular Analysis of Respiratory Syncytial Virus In Children With Lower Respiratory Track Infections
İmran SAĞLIK, Dilek ÇOLAK, Derya MUTLU, Rabia Can SARINOĞLU, Dilara İNAN, Nurgül GÜNAY, Gözde ÖNGÜT, Nihal OYGÜR, Oğuz DURSUN **42-49**

<ul style="list-style-type: none">• Kan ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan <i>Candida albicans</i> Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması <i>Investigation of Phospholipase Activity in Candida albicans Strains Isolated From Blood and Oral Cavity Specimens</i> Buğse TUNÇ, Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ, Mine DOLUCA DERELİ	50-60
<ul style="list-style-type: none">• Gastroduodenal Yakınmaları Olan Hastaların Dışkı Örneklerinde <i>Helicobacter pylori</i> Antijen Pozitifliğinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi <i>Retrospective Evaluation of Helicobacter pylori Antigen Positivity in the Stool Samples of Patients with Gastroduodenal Complaints</i> Tevhide ZİVER SARP, Harika Öykü DİNÇ, Doğukan ÖZBEY, Seher AKKUŞ, Beyza ASLAN, Merve CİHAN, Nesrin GAREAYAGHI, Hrisi Bahar TOKMAN, Bekir KOCAZEYBEK	61-69
<ul style="list-style-type: none">• Türkiye’de Son On Yılda Saptanan Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Viral Etkenlerin Değerlendirilmesi ve Bibliyometrik Analizi* <i>Evaluation and a Bibliometric Analysis of Viral Factors in Central Nervous System Infections Detected in the Last Ten Years in Turkey</i> Berke GÖKKILIÇ, Candan ÇİÇEK, Aşşın ZEYTİNOĞLU, Ekin KARTAL	70-84
<u>EDİTÖRE MEKTUP / LETTER TO EDITOR</u>	
<ul style="list-style-type: none">• Human Papillomavirüs DNA Pozitif ve E6/E7 mRNA Negatif, Anormal Sitolojili Servikal Örneklerin Genotiplendirilmesi <i>Genotyping of HPV DNA Positive and HPV E6/E7 mRNA Negative Cervical Samples with Abnormal Cytology</i> Aylin ALTAY KOÇAK, İpek TÜNEY, Koray ERGUNAY, Alp USUBÜTÜN, Kunter YÜCE, Irene GÖRZER, Elisabeth PUCHHAMMER-STÖCKL, Gülendaml BOZDAYI	85-88
YAZARLARA BİLGİ	VII-VIII

Bebek ve Küçük Çocuk Gıdalarında Bakteriyele Sağlık Riskleri

Bacterial Health Risks in the Food of the Infants and Young Children

Emine Genç*¹, Aydın Vural**²

*Diyarbakır İl Sağlık Müdürlüğü, Halk Sağlığı Hizmetleri Başkanlığı, Diyarbakır, Türkiye

**Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

Atf/Cite as: Genç E, Vural A. Bebek ve küçük çocuk gıdalarında bakteriyel sağlık riskleri. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):1-10.

Öz

Bebek ve küçük çocukların bağışıklık sistemi tam olarak gelişmemiştir. Bu dönemde beslenme hem büyüme hem de sağlık açısından önem taşımaktadır. Birçok bilimsel çalışmada devam formülleri ve ek gıdalarda patojen veya fırsatçı patojen varlığı belirlenmiştir. Hammadde, üretim, koruma ve tüketim aşamalarında bu gıdaların mikroorganizmalarla kontaminasyonunun engellenmesi gerekmektedir. Bebek ve küçük çocuk gıdalarındaki mikroorganizmaların belirlenmesi olası halk sağlığı riskleri açısından önemlidir. Bu çalışmada, bebek ve küçük çocuk gıdalarında saptanan patojen, fırsatçı patojen mikroorganizmalar ve halk sağlığı riskleri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Devam sütü, ek gıda, patojen, mikrobiyolojik kalite, sağlık

ABSTRACT

The immune system of infants and young children is not fully developed. In this period, nutrition is important for both growth and health. Many scientific studies have identified the presence of pathogens or opportunistic pathogens in follow-on formulas and supplementary foods. Contamination of these foods with microorganisms should be prevented during raw material, production, storage and consumption stages. Identification of microorganisms in the food of infants and young children is possibly important for public health. In this study, it is aimed to give information about pathogens, opportunistic pathogens and public health risks in infant and young children's food.time. The need for comprehensive studies on host immune response is evident.

Keywords: Follow-on milk, supplementary food, pathogen, microbiological quality, health

Alındığı tarih / Received:
30.04.2020 / 30.April.2020

Kabul tarihi / Accepted:
03.07.2020 / 03.July.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

E. Genç 0000-0001-6845-1658
A. Vural 0000-0002-6232-2131

✉ avural@dicle.edu.tr

GİRİŞ

Türk Gıda Kodeksi (TGK)'ne göre bebek ve küçük çocuk beslenmesi amaçlı hazır gıdalar; bebek formülleri, devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdaları olarak sınıflandırılmıştır. Tebliğe göre 0-1 yaş grubu "bebek" olarak tanımlanmaktadır. Bebek formülleri, anne sütü alamayan bebeklerin ilk aylarda, tamamlayıcı besinlere başlayınca kadar besin gereksinimini karşılayan ürünlerdir⁽¹⁾. Altıncı aydan başlayarak bebek beslenmesinde kullanılan sıvı veya toz formüller ise devam formülleri olarak nitelendirilmektedir⁽²⁾. On iki-otuz altı ay arası yaş

grubu ise küçük çocuk olarak adlandırılmaktadır. Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları işlenmiş veya işlenmemiş tahıllardan, baklagillerden veya kök ve gövdelelerinde nişasta bulunan bitkilerden üretilmektedir. Bu ürünler tamamlayıcı beslenme amacıyla kullanılmaktadır⁽³⁾.

Bebek ve küçük çocukların beslenmesinde kullanılan bebek mamaları ve diğer ek gıdaların uygunsuz üretimi sonucu, gıda hazırlama ve depolama sürecinde kontaminasyonlar görülebileceği ve bu gıdaların patojen mikroorganizmaları içerebilecekleri bildirilmiştir⁽⁴⁾. Bebek ve küçük çocuk mamaları ile ek

gıdalarının üretimi sırasında uygulanan yüksek ısı işlemler, ham maddede bulunabilecek bakterilerin vejetatif formlarını yok edebilmekte ancak sporlu bakterilerin spor oluşturarak yaşamlarını sürdürmesine engel olamamaktadır⁽⁵⁾.

Bebek ve Küçük Çocuk Gıdalarında Mikrobiyolojik Kriterler

Bebek mamaları üretiminde hazırlanan karışımlara paketleme öncesi 85-94°C'de 30 sn süresince pastörizasyon uygulanırken, paketleme sonrasında 118°C'de 10-15 dakika veya 142°C'de 2-3 sn sterilizasyon uygulanmaktadır⁽⁶⁾. Bebek ve küçük çocuk mamaları ile ek gıdaların tamamı steril ürünler değildir; ancak ulusal standartlara da uygun olmaları beklenmektedir⁽⁷⁾. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Temmuz 2004'te İsviçre'de toz ve hazır bebek mamaları hakkında yapılan toplantıda bebeklerde enfeksiyona neden olabilecek ve bebek mamalarında bulunabilecek mikroorganizmalar tartışılmış ve A, B, C olmak üzere 3 kategoride değerlendirilmiştir: A sınıfında *Enterobacter sakazakii* ve *Salmonella* spp. bulunmaktadır. Bu bakterilerin bebek mamaları kaynaklı hastalıklara neden oldukları ve bebek mamalarından izole edildikleri epidemiyolojik ve mikrobiyolojik çalışmalar ile kanıtlanmıştır. B sınıfında *Escherichia vulneris*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* bulunmaktadır. Bu bakterilerin bebeklerde hastalıklara neden oldukları halde bu hastalıkların kaynağının bebek mamaları olduğuna dair yeterli epidemiyolojik ve mikrobiyolojik çalışma bulunmamaktadır. C sınıfında *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus* yer almaktadır. Bu bakterilerin bebek mamalarından kaynaklanan hastalık yaptıklarını gösteren çalışmalar yetersizdir⁽⁸⁾. Günümüzde birçok çalışma çeşitli bebek gıdalarında bu bakterilerin varlığını ortaya koymaktadır. Sezer ve ark.⁽⁹⁾ bebek sütü ve devam formüllerinde %10 *B. cereus* ve %6 düzeyinde *L. monocytogenes* varlığı bildirmişlerdir. Sadek ve ark.⁽¹⁰⁾ çeşitli bebek gıdalarından elde ettikleri izolatların %10.2'sini *B. cereus*

(n=45) olarak tanımlamışlardır. Bu izolatlarda enterotoksin gen varlığı Hemolytic BL complex (*hblA*), non-hemolytic enterotoxin complex (*nheC*) ve cytotoxic gene (*cytK*) için sırasıyla %11.1, %71.1 ve %95.5 düzeyinde bulunmuştur. Brett ve ark.⁽¹¹⁾ beş aylık bir kız çocuğunda dışkı örnekleri ve rektal yıkama ile *C. botulinum* tip B ve tip B botulinum toksinlerini saptayarak bebek botulismusu teşhisi koymuşlardır. Aynı çalışmada hastanın evinden alınan açılmış ve açılmamış (aynı parti) bebek mamalarından da *C. botulinum* tip B izole edilmiştir. Codex Alimentarius'ta, hazır toz mamaların içeriğinde yer alması gereken besin elementleri ve ürün güvenliği açısından üründe bulunabilecek mikotoksin, ağır metal, pestisit, çeşitli patojen ve indikatör mikroorganizmalara dair önerilen sınırlamalar belirlenmiştir. Tablo 1'de Codex Alimentarius Komisyonu'na⁽¹²⁾ göre ve Tablo 2'de Türk Gıda Kodeksi'ne⁽¹³⁾ göre bebek formülleri, devam formülleri ve ek gıdalarındaki mikrobiyolojik kriterler gösterilmiştir.

Bebek ve küçük çocuk gıdalarında bulunabilen önemli patojen bakteriler

Salmonella spp.

Enterobacteriaceae üyesi olan *Salmonella* cinsi bakterilerin sınıflandırılması, suşların biyokimyasal, serolojik ve moleküler farklılıklarına göre yapılabilmektedir. *Salmonella* cinsinin tüm üyeleri *Salmonella bongori* ve *Salmonella enterica* altında iki tür olarak toplanmışlardır⁽¹⁴⁾. *Salmonella* spp. aerob veya fakültatif anaerob, selektif katı besiyerlerinde 2-3 mm çapında yuvarlak, çoğu kez kabark, düzgün yüzeyle ve düz kenarlı koloniler şeklinde üreyebilirler. Nitratı nitrite indirgerler, sitratı kullanırlar. *Salmonella* Typhi dışında glukozdan asit ve gaz oluşturabilirler.

Tablo 1. Codex Alimentarius Komisyonu'na göre bebek ve küçük çocuk toz formüllerinde patojen bakteri ve üretim hijyeni kriterleri⁽¹²⁾.

Bakteri	n	c	m (kob)	M (kob)
Mezofilik Aerobik Bakteri	5	2	500/g	5000/g
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	2	0/10 g	
<i>Salmonella</i> spp.	60	0	0/25 g	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> türleri)	30	0	0/10 g	

Tablo 2. Türk Gıda Kodeksi'ne göre bebek formülleri ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdalarında mikrobiyolojik kriterler⁽¹³⁾.

Besin	Mikroorganizma	n	c	Mikrobiyolojik sınırlamalar	
				m (kob/g-mL)	m (kob/g-mL)
Bebek sütleri ve devam sütleri (özel tıbbi amaçlı diyet besinler dahil)	<i>Bacillus cereus</i>	5	5	5x10 ¹	5x10 ²
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	10	10	0/25 g-mL	0/25 g-mL
	<i>Salmonella</i> spp.	10	10	0/25 g-mL	0/25 g-mL
	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	10	0/25 g-mL	0/25 g-mL
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları (özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar dahil)	<i>Bacillus cereus</i>	5	5	10 ²	10 ³
	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	5	<10 ¹	
	<i>Salmonella</i> spp.	5	5	0/25 g-mL	0/25 g-mL
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	5	0/25 g-mL	0/25 g-mL

Salmonella Cholerasuis ve *Salmonella* Paratyphi dışında genelde H₂S (Hidrojen Sülfür) oluşturur ve *Salmonella* Typhi dışında ornitini, *Salmonella* Paratyphi A dışında lizini dekarboksile ederler. *Salmonella*'lar genellikle laktozu kullanmazlar. Çoğunlukla gaz oluştururlar yani aerojeniktirler. Ancak *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Gallinarum gaz oluşturmaz yalnızca asit oluştururlar. Sükroz, salisin, inositol fermentasyonları negatif olan *Salmonella*'ların lipaz ve deoksiribonükleaz enzimleri yoktur⁽¹⁵⁾.

Salmonella türlerinin üredikleri sıcaklık aralığı geniştir ve en iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık 37°C'dir. Optimum nötr pH değerinde ürerler ve pH 4.5'in altında ise gelişmeleri inhibe olur. Spor ve kapsül oluşturmazlar⁽¹⁶⁾. *Salmonella* spp. 0.94-0.99 su aktivite değeri (a_w) olan gıdalarda üreyebilmektedirler. *Salmonella* spp.'nin %8'lik tuzlu suda üremelerinin engellendiği, fakat canlılıklarını sürdürdükleri görülmüştür, bu nedenle de sahil yakınlarındaki deniz sularından izole edilebilmektedirler. Protein varlığında kuru ortama oldukça direnç gösteren *Salmonella* spp. kurutulmuş ve toz haline getirilmiş gıdalarda 13 yıl canlı kalabilmektedirler⁽¹⁵⁾. Kurutulmuş süt ürünlerinde *Salmonella* kontrol çabalarına rağmen 1985'ten 2005'e kadar 20 yıllık dönemde bebeklerde toz bebek maması tüketimine bağlı en az 6 *Salmonella* salgını meydana gelmiştir⁽¹⁷⁾. Formül mama ve ek gıdalarda *Salmonella* spp. varlığı %0-4.0 arasında bulunmuştur^(9,18). Tahıl bazlı bebek unlarında belirlenen *Enterobacteriaceae* izolatlarının (206 adet) %0.97'si *Salmonella* spp. olarak tanımlamıştır⁽¹⁹⁾.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes Gram pozitif, fakültatif anaerob, kapsül ve spor oluşturmeyen patojen bir mikroorganizmadır. Optimum gelişme sıcaklığı 35-37°C olmakla birlikte, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında gelişebilmektedir⁽¹⁶⁾. Bugüne kadar 3'ü patojen olmak üzere 6 türü tanımlanmıştır: *L. monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* ve *Listeria grayi*. Bunlardan *L. monocytogenes* en önemli patojendir. Diğer iki patojen ise *L. ivanovii* ve *L. innocua*'dır⁽²⁰⁾. *L. monocytogenes*'in gelişmesi için ideal ortam oluşturabilen başlıca gıda maddeleri; peynirler, sütler, ısıl işlem görmüş sosis, sucuk, salam gibi et ürünleri, fümehal, deniz kabukluları ve işlenmiş sebzelere⁽²¹⁾. Listeriozis *L. monocytogenes* ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu insanlarda menenjit, ensefalit, abort, septisemi ve hatta ölümlere varan ciddi enfeksiyonlara neden olan bir hastalıktır. İntraselüler (hücre içi) bir patojen olarak nitelendirilen *L. monocytogenes* en çok yenidoğanlar, gebeler, yaşlı ve immün sistemi baskılanmış kişiler için risk oluşturmaktadır. Hastalık insanlarda akut-septik form, merkezi sinir sistemi (MSS) formu, glandular form, lokal form ve kronik septik form olmak üzere 5 farklı şekilde seyretmekte ve yüksek mortalite oranı (%20-30) nedeniyle önem arz etmektedir⁽²²⁾. Genç⁽¹⁸⁾ bebek formülü, devam formülü ve çeşitli ek gıdalarda *L. monocytogenes* saptanamamıştır. Ancak Sezer ve ark.⁽⁹⁾ bebek sütü ve devam formüllerinde %6 düzeyinde *L. monocytogenes* varlığı bildirmişlerdir.

Cronobacter sakazakii

Cronobacter spp. Gram negatif, fakültatif anaerob, yaklaşık 1-3 mm büyüklüğünde, 6- 47°C arasındaki sıcaklıklarda (optimum 39°C) gelişebilen, asit koşullarda orta dereceye dirençli, düşük sıcaklık ve düşük su aktivitesi değerlerinde canlılığını koruyan (4°C ve 0.3-0.69 a_w) bakterilerdir⁽²³⁾. Yeni sınıflandırılmış bir cins olup, önceleri *Enterobacter* cinsi içerisinde yer almıştır. Halen 7'tür *Cronobacter* tanımlanmaktadır: *C. sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis* (alt türleri *C. dublinensis*, *Cronobacter lausannensis* ve *Cronobacter laktaridi*), *Cronobacter condimenti* ve *Cronobacter universalis*. *Cronobacter* spp. yenidoğanlarda ve bebeklerde menenjit, enterokolit ve septisemi gibi hayati tehlike içeren enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Özellikle *C. sakazakii*, *C. malonaticus* ve *C. turicensis* enfekte yenidoğanlardan izole edilmiştir. Bununla birlikte hepsi geriye dönük olarak bebeklerde veya yetişkinlerde klinik enfeksiyon vakaları ile ilişkilendirildiğinden tüm türleri patojen olarak kabul edilmektedir⁽²⁴⁾.

Bebeklerde *C. sakazakii* salgınlarından dolayı ölüm oranının %40-80 olduğu, yaşama devam eden bebeklerin ise ilerleyen dönemlerde nörolojik hastalıklarla karşı karşıya kaldığı bildirilmiştir. Bu salgınlardan kontamine olmuş bebek mamaları (formülleri) sorumlu tutulmuştur. Bebek mamaları, mama üretim aşamalarından herhangi biri sırasında doğrudan ya da mamaların hazırlanması esnasında kullanılan ekipmanlardan dolayı yoldan kontamine olabilmektedir. Bu durum ülkemizde de bebek ve devam formüllerinde *C. sakazakii* analizini gerektirmiş ve 2008 yılından itibaren bu analizler zorunlu hâle getirilmiştir^(25,26). Devam sütlerinde *C. sakazakii* varlığı %1-25^(27,28), çeşitli ek gıdalarda ise %10-12^(27,29) düzeyinde bulunmuştur. Genç⁽¹⁸⁾ ise bebek formülleri, devam formülleri ve ek gıdalarda bu bakterinin belirlenemediğini bildirmiştir.

Cronobacter spp. silikon, cam, paslanmaz çelik, lateks ve polikarbonat dâhil çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedir. Toprak, su ve sebzeler etkenin en

olası kaynakları arasında olup kemirgenler ve sineklerin de bulaşmada rol oynayabilecekleri bildirilmiştir⁽²³⁾.

***Escherichia coli* ve *Escherichia coli* O157:H7**

Gıdalarda önemli bir kalite belirleyicisidir. *E. coli*'nin gıdalarda varlığı, gıdanın fekal olarak kontamine olduğunun veya saklama aşamalarında hijyen kurallarına dikkat edilmediğinin göstergesidir⁽³⁰⁾. *E. coli* patojenite özelliklerine göre 4 gruba ayrılmaktadır: *Enterotoksijenik E. coli* (ETEC), adından da anlaşıldığı üzere enterotoksin üretmekte ve 36 aydan küçük çocuklarda ishale neden olmaktadır. *Enteropatojenik E. coli* (EPEC), süt çocuklarında patojen etki gösterek ishal salgınına neden olan türdür. *Enterohemorajik E. coli* (EHEC), *E.coli* O157:H7 olarak adlandırılmaktadır. İshalin yanında kan ve böbrek hastalıklarına neden olan en tehlikeli *E. coli* türüdür. *Enteroinvaziv E. coli* (EIEC), dokulara yerleşip lezyonlara neden olan patojen türdür⁽¹⁸⁾. *E. coli* O157:H7'nin, en çok sığır ve koyunların sindirim sistemleri ve dışkılarında bulunduğu ve salgınların çoğunun bu dışkılarla veya bu hayvanların sindirim sistemiyle bir şekilde kontamine olmuş gıdalardan dolayı meydana geldiği bildirilmiştir⁽³¹⁾.

Çetingürbüz⁽³²⁾ bebek mamalarında, Yao ve ark.⁽¹⁹⁾ ise tahıl bazlı bebek unlarında tespit ettikleri *Enterobacteriaceae* izolatlarının %14.3 ve %6.79'unu *E. coli* olarak tanımlamıştır. Bebek mamaları, kurutulmuş bebek gıdaları ile bebek sütü ve devam formüllerinde *E. coli* varlığı sırasıyla %2⁽⁵⁾, %2.04⁽²⁹⁾ ve %14⁽⁹⁾ olarak bildirilmiştir. Bebek mamaları ve gıdalarda yapılan çalışmalarda *E. coli* O157:H7 tespit edilememiştir^(18,33).

Bacillus cereus

Bacillus cereus ishal, kusma ve ölümcül menenjite varan hastalıklara veya gıda bozulmasına neden olan Gram pozitif, çubuk şeklinde ve sporlu bir bakteridir⁽³⁴⁾. *B. cereus* sporları kurutma, vakumlama, dondurma ve ısıtma işlemlerine dayanıklıdır⁽³⁵⁾. Sporları hidrofobik özellikte olduğu için yüzeylere (alet-ekipman) yapışma eğiliminde olduğundan

B. cereus gıda güvenliği açısından önemli bir bakteridir. *B. cereus* genellikle toprak kökenli olup; et, sebze, süt ve süt ürünlerinden sıklıkla izole edilmektedir⁽³⁶⁾. Pastörize gıda ürünlerinde en yaygın gıda kaynaklı zehirlenme nedeni olarak gösterilen *B. cereus* aynı zamanda mama endüstrisi tarafından bebek maması kirleticisi olarak da tanımlanmaktadır⁽³⁴⁾. Sütün elde edildiği hayvanın sağlık durumu, sağım hijyeni, ahır hijyeni, işletme hijyeni, ekipman hijyeni ve personel hijyenindeki eksiklikler sonucu *B. cereus* sporları ile kontaminasyon oluşabileceği ve spor formunun pastörizasyonda canlı kalabildiği bildirilmiştir⁽³⁷⁾.

Bacillus cereus beta-laktamaz üretir ve penisilin, sefalosporin ve trimetoprim-sülfametoksazole karşı dirençlidir. Aminoglikozitler, klindamisin, vankomisin, kloramfenikol, imipenem ve eritromisine ise genel olarak duyarlıdır. Ancak immün sistemi baskılanmış yenidoğanlarda vankomisin, gentamisin, imipenem ya da klindamisin tedavilerine rağmen *B. cereus* enfeksiyonları ölümle sonuçlanabilmektedir⁽³⁸⁾.

Bacillus cereus prevalansı bebek mamalarında %42⁽³⁹⁾; bebek sütü ve devam formüllerinde %10⁽⁹⁾ olarak bulunmuştur. Meyveli sütlü, sebze sütlü, ballı sütlü, pirinçli sütlü ve buğdaylı sütlü bebek mamalarında *B. cereus* varlığı sırasıyla %62.2, %26.6, %30, %15 ve %20; ortalama *B. cereus* sayısı ise sırasıyla 1.50, 0.65, 0.68, 0.36 ve 0.45 log kob/g olarak bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Libya'da 84 ticari bebek gıdasının mikrobiyolojik kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada *Bacillus* spp. varlığını %64.3 düzeyinde bildirmiştir. *Bacillus* spp. basitrasin (%63.6), ampisilin (%54.5), sefalosporin (%36.4), penisilin (%18.1) ve nalidiksik asite (%18.2) dirençli; kloramfenikol, kanamisin, gentamisin ve streptomisine ise duyarlı bulunmuştur⁽⁴⁰⁾.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus spp. Gram pozitif, fakültatif anaerob, sporsuz, hareketsiz ve katalaz pozitif mikroorganizmalardır⁽⁴¹⁾. *S. aureus* çevrede çok yaygın bulunan ve çeşitli enfeksiyonlara yol açan önemli bir patojendir. Erişkinlerin burun bölgelerinde, deride, üst solunum sistemi ve genital bölgelerinde koloni oluştur-

maktadır⁽⁴²⁾. *S. aureus* protein ve nişasta oranı yüksek gıdalarda üreme potansiyeli yüksektir; bu nedenle de et, süt, balık, patates, makarna ve bunlardan üretilen gıdalarda görülmektedir⁽⁴¹⁾.

Üretim, hazırlama ve depolama aşamalarında hijyenik koşullarda işlenmeyen gıdalarda *S. aureus* bulunma olasılığı yüksektir⁽⁴¹⁾. Umoh ve ark.⁽⁴³⁾ tarafından bebek mamalarında *Staphylococcus* spp. kontaminasyonunun %96.6 olduğu ve bunların %52'sinin ise *S. aureus* olduğu saptanmıştır. Wang ve ark.⁽⁴⁴⁾ tarafından bebek gıdalarında elde edilen *S. aureus* izolatları (54 izolat) eritromisin (%75.9), siprofloksasin (%51.9), trimetoprim/sulfametoksazol (%27.8), gentamisin (%22.2), tetrasiklin (%18.5) ve sefoksitine (%3.7) dirençli bulunmuştur. İzolatların %83.3'ü en azından bir antimikrobiyal maddeye, izolatların %35.2'si ise üç veya daha fazla antimikrobiyal maddeye dirençli bulunmuştur (çoklu direnç).

Bebek ve küçük çocuk gıdalarında bulunabilen fırsatçı patojen bakteriler

***Pantoea* spp.**

Toprak, su, atık su, meyve ve sebzelerden izole edilen *Pantoea* spp. insan gastro intestinal sisteminde de doğal olarak bulunur⁽⁴⁵⁾. *Pantoea* spp. septik şok veya akut sepsis ile sonuçlanabilen nozokomiyal enfeksiyon etkeni olup, atipik klinik belirtiler enfeksiyonun kökenini belirlemeyi güçleştirmektedir⁽⁴⁶⁾. Çocuklarda *Pantoea* spp. osteomyelit, apse, septisemi, septik artrit, idrar yolu enfeksiyonları ve menenjit (ender olarak) sorumlu tutulmaktadır⁽⁴⁷⁾.

Bebek mamalarında saptanan *Enterobacteriaceae* türleri içerisinde *Pantoea* spp. varlığı Sani ve Yi⁽⁴⁸⁾ tarafından %25, Estuningsih ve ark.⁽⁴⁹⁾ tarafından %34.29 olarak bildirilmiştir. Yao ve ark.⁽¹⁹⁾ ise tahıl bazlı bebek unlarında buldukları *Enterobacteriaceae* izolatlarının (206 adet) %14.08'ini *Pantoea* spp. olarak tanımlamışlardır. Genç⁽¹⁸⁾ 135 örnekte yaptığı çalışmada tavuklu karışık sebze ek gıda, bebek bisküvisi, yaban mersinli pirinç patlağı ve devam sütünde (%2.96) *Pantoea* spp. varlığı bildirmiştir. Bu çalışmada belirlenen *Pantoea* spp. izolatlarında çoklu

antibiyotik direnci saptanmıştır.

Klebsiella pneumoniae

Enterobacteriaceae familyasından koliform grubunda yer alan Gram-negatif, fakültatif anaerob, hareketsiz, sporsuz ve genellikle kapsüllü bir bakteridir. Kuru ortama dirençli olan *K. pneumoniae* doğada da yaygın olarak bulunmaktadır⁽²¹⁾. Bebek mamalarında saptanan *Enterobacteriaceae* türleri içerisinde *K. pneumoniae* varlığı Sani ve Yi⁽⁴⁸⁾ tarafından %13.46; Estuningsih ve ark.⁽⁴⁹⁾ tarafından %8.57; Zhou ve ark.⁽⁷⁾ tarafından %46.15 olarak bulunmuştur. Yao ve ark.⁽¹⁹⁾ ise tahıl bazlı bebek unlarında buldukları *Enterobacteriaceae* izolatlarının (206 adet) %9.7'sini *K. pneumoniae* olarak tanımlamışlardır. *K. pneumoniae*, 2014 yılı WHO'nun antibakteriyel direncin genel durumu hakkındaki raporunda, uluslararası tehdidin ilk üç bakterisinden biri olarak kabul edilmiştir⁽⁵⁰⁾. Zhou ve ark.⁽⁷⁾ *K. pneumoniae* izolatlarının %100 oranında oksasilin ve sefaleksine direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Genç⁽¹⁸⁾ 135 örnekten 7'sinde (%5.19) *K. pneumoniae* bulmuştur. Bu çalışmada saptanan *K. pneumoniae* izolatlarında çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır.

Enterobacter cloacae

Enterobacter cloacae insan gastrointestinal sisteminde doğal olarak bulunur. Etken doğada da yaygın olarak görülmektedir. Alt solunum yolu ve idrar yolu enfeksiyonlarından sorumlu tutulan *E. cloacae* önemli bir hastane kaynaklı patojendir⁽⁵¹⁾. Yao ve ark.⁽¹⁹⁾ tahıl bazlı bebek unlarında buldukları *Enterobacteriaceae* izolatlarının (206 adet) %21.84'ünü; Çetingürbüz⁽³²⁾ ise bebek mamalarındaki *Enterobacteriaceae* izolatlarının %7.1'ini *E. cloacae* olarak tanımlamıştır. Shaker ve ark.⁽²⁸⁾ tarafından bebek devam sütlerinde *E. cloacae* belirlenmezken, bebek gıdalarında %20 düzeyinde saptanmıştır. Genç⁽¹⁸⁾ tarafından armutlu muzlu muhallebi örneğinde tespit edilen *E. cloacae* (%0.74) izolatının çoklu antibiyotik direnci (ampisilin, eritromisin, tetrasiklin) gösterdiği bildirilmiştir.

Serratia plymuthica

Fırsatçı ve hastane dışı patojenler olarak kabul edilen *Serratia* spp. toprak, bitki ve sularda yaygındır⁽⁵²⁾. *Serratia* kaynaklı enfeksiyonlar genellikle geniş spektrumlu antibiyotik alan ve invaziv prosedürler geçiren hastalarda görülür⁽⁵³⁾. *S. plymuthica* ise sepsis, peritonit, pnömoni ve yara enfeksiyonlarına neden olan bir patojen olarak tanımlanmıştır. Etkenin güçlü bir biyofilm oluşturma potansiyeli bildirilmiştir⁽⁵⁴⁾. Yao ve ark.⁽¹⁹⁾ tahıl bazlı bebek unlarında buldukları *Enterobacteriaceae* izolatlarının (206 adet) %2.43'ünü *Serratia* spp. olarak tanımlamışlardır. Chap ve ark.⁽²⁷⁾ 136 devam sütü, 179 bebek gıdası ve 3 bitkisel çay örneğinin incelendiği araştırmalarında *S. plymuthica* varlığını bildirmişlerdir. Genç⁽¹⁸⁾ tarafından elmalı pirinç patlağında saptanan *S. plymuthica* (%0.74) izolatı incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur.

Sphingomonas paucimobilis

Sphingomonas spp. dezenfektan ve toksik kimyasallara dirençli olup doğada yaygın olarak bulunur. Su, bitki ve topraktan izole edildikleri bildirilmiştir⁽⁵⁵⁾. Gram negatif, aerobik, sporsuz bir bakteri olan *S. paucimobilis* septisemi, menenjit ve hastane kaynaklı enfeksiyonların etkeni olarak bildirilmiştir. *S. paucimobilis* distile su depoları, respiratörler, termometre propları, hemodiyaliz aletleri ve lavabolar gibi çeşitli cihaz ve mekanlardan da izole edilmiştir⁽⁵⁶⁾. Genç⁽¹⁸⁾ tarafından yapılan çalışmada karışık sebze püresinde saptanan *S. paucimobilis* izolatının amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, siprofloksasin, sefotaksim, norfloksasin ve tetrasikline karşı çoklu antibiyotik direnci gösterdiği bildirilmiştir.

Bacillus pumilus

Gram pozitif, spor oluşturabilen, fakültatif anaerob bir bakteri olan *B. pumilus* nadiren gıda zehirlenmeleri, sepsis, endokardit, cilt enfeksiyonları, immün yetmezlik, santral venöz kateter enfeksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır^(57,58). Sadek ve ark.'nın⁽¹⁰⁾ bebek gıdalarındaki çalışmasında *B. pumilus* varlığı %18,32 düzeyinde bulunmuştur. Genç⁽¹⁸⁾ tarafından yapılan bir çalışmada ise devam sütü örneğinde

(%0.74) *B. pumilus* tespit edilmiştir. *B. pumilus* izolatu amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, penisilin ve sefo-taksime dirençli bulunmuştur.

Koagulaz negatif stafilokoklar

Kontaminant bakteriler olarak bilinen Koagulaz Negatif Stafilokoklar (KNS) günümüzde intravenöz kateterlerden, prostetik kapaklardan, ortopedik pro-tezlerden ve serebrospinal sıvı şantlarından köken alan hastane enfeksiyonlarına neden olan patojenler olarak kabul edilmektedir⁽⁵⁹⁾. Genç⁽¹⁸⁾ tarafından devam sütü, bebek bisküvisi, organik elmalı çocuk bisküvisi ve papatya çayı örneklerinde *S. epidermidis* tespit edilmiştir (%2.96). İzolatlar penisilin (%100), tetrasiklin (%75), oksitetrasiklin (%75) ve vankomisi-ne (%25) dirençli bulunmuştur. KNS'lar arasında *S. hominis* yeni doğan ve immünsüprese kişilerde septisemi, bakteriyemi ve endokardit ile ilişkilendirilmiştir⁽⁶⁰⁾. Genç⁽¹⁸⁾ tarafından yürütülen bir çalışmada armutlu-şeftalili-ananaslı meyve püresi, armutlu muzlu muhallebi, sütlü peynirli pekmezli 8 tahıllı ek gıda ve devam formülü örneklerinde *S. hominis* saptanmıştır (%2.96).

Enterokoklar

Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Sistemi araştırmasına göre enterokoklar, hastane kaynaklı enfeksiyonların dördüncü en sık nedeni olup bu bak-terilere karşı gün geçtikçe antimikrobiyal direnç art-maktadır. Enterokok kaynaklı bakteriyemiden ölüm oranları %12-68 ve sepsis nedeniyle ölüm oranları %4-50 düzeyinde bildirilmiştir⁽⁶¹⁾. Genç⁽¹⁸⁾ tarafından karışık meyve püresi, pirinçli sebze püresi, bebek sütü ve yaban mersinli pirinç patlağı örneklerinde (%2.96) *Enterococcus casseliflavus* tespit edilmiştir. *E. casseliflavus* izolatları penisiline düşük direnç gös-termiştir (%20). Aynı çalışmada organik havuç püresi örneğinde *E. faecium* saptanmıştır. Bu etken izolatu ise trimethoprim/sulfamethoksazole direnç göster-miştir (%100).

SONUÇ

Bebek formülleri, devam formülleri ve ek gıdalardan

oluşan bebek ve küçük çocuk gıdalarında patojen veya potansiyel patojen birçok bakteri saptanmıştır. Bu tip gıdalarda hammaddeden başlayarak üretim, depolama, koruma ve hazırlama aşamalarında kalite kontrol sistemlerinin eksiksiz uygulanması ve hijyenik üretim koşullarına uyulması zorunludur. Hastane enfeksiyonları ile bu tür gıdalardaki bakteriler arasın-daki ilişkinin ortaya konulması için daha fazla çalış-maya gereksinim bulunmaktadır.

Toz mamalar hazırlanırken kullanılan suyun önce-den kaynatıldıktan veya en az 70-80°C'de ısıtıldık-tan sonra soğutulmuş olarak kullanılması su kaynaklı bulaşmaları önlemek için etkili olacaktır. Sıvı mamalar ve ek gıdalarda ambalajlarının açılması veya tüketilmeleri sırasında kontaminasyon oluşa-bileceğinden hijyenik uygulamalara özen gösteril-melidir. Özellikle hastanelerde mama hazırlama ve muhafaza aşamalarında bakteri kontaminasyonu veya çoğalması göz önünde bulundurulmalıdır. Mama hazırlamada mesai saatleri ve hafta sonları-nı da kapsayacak şekilde gıda güvenliği konusunda eğitilmiş sağlık görevlilerinin görevlendirilmesi gerekmektedir. Mama ve ek gıdaların hasta refa-katçilerinin insiyatifine bırakılmaksızın tüketile-ceği zaman teslim edilmesi önemlidir. Tüketilmeyen gıdaların uygun koşullarda gıda güvenilirliği ilkeleri veya üretici firma önerileri dikkate alınarak mini-mum süreyle korunması veya tüketilmemesi gerek-mektedir. Formül mamalar ile ek gıdaların hazır-lanma, tüketim ve koruma koşulları konusunda toplumu bilinçlendirmek amacıyla yaygın eğitimler verilmesi de yararlı olacaktır.

Teşekkür

Bu derleme Dicle Üniversitesi Proje Koordinatörlüğü tarafından 18.002 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması: Bu çalışmada finansal veya finansal olmayan herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Conflict of Interest: There is no financial or non-financial conflict of interest in this study.

KAYNAKLAR

1. TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Türk gıda kodeksi bebek formülleri tebliği (No: 2014/31). Resmi Gazete (29089). 15.08.2014.
2. TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Türk gıda kodeksi devam formülleri tebliği. (No: 2014/32) Resmi Gazete (29089). 15.08.2014.
3. TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Türk gıda kodeksi bebek ve küçük çocuk ek gıdaları tebliği. Resmi Gazete (No: 2007/5). 01.11.2007.
4. Bahçeci T, Çakmak Sancar B, Özpinar H. Bebek beslenmesinde kullanılan gıdaların mikrobiyolojik kalitelerinin araştırılması. Aydın Gastronomi. 2018;2(1):15-20.
5. Ergün F, Ergün Ö. Ülkemizde tüketime sunulan yerli ve ithal bebek mamalarının genel mikrobiyolojik kaliteleri ve bazı patojenlerin varlığı yönünden incelenmesi. Gıda. 1994;19(6):373-6.
6. Gökçay G, Eren T, Devocioğlu E. Bebek mamalarındaki katkı maddeleri. Çocuk Dergisi. 2012;12(2):60-5.
7. Zhou X, Gao J, Huang Y, Fu S, Chen H. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. Afr J Microbiol Res. 2011;5(19):3073-7. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.867>
8. Gültekin M, Demirel NN. Hazır toz bebek mamaları ve *Enterobacter sakazakii*. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2006;36(1):67-74.
9. Sezer C, Vatanserver L, Bilge N. The microbiological quality of infant milk and follow - on formula. Van Vet J. 2015;26(1):31-4.
10. Sadek ZI, Abdel-Rahman MA, Azab MS, Darwesh OM, Hassan MS. Microbiological evaluation of infant foods quality and molecular detection of *Bacillus cereus* toxins relating genes. Toxicol Rep. 2018;5:871-7. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.013>
11. Brett MM, McLauchlin J, Harris A, et al. A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. J Med Microbiol. 2005;54(Pt 8):769-76. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46000-0>
12. Codex Alimentarius Commission (CAC). Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP 66. 2008. http://www.fao.org/input/download/standards/11026/CXP_066e.pdf. (Erişim:02.07.2020)
13. TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Türk gıda kodeksi mikrobiyolojik kriterler yönetmeliği. Resmi Gazete (28157). 29.12.2011.
14. Ağay Z. Farklı kaynaklardan izole edilen *Salmonella* suşlarının bazı virülans faktörlerinin incelenmesi [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2014.
15. Özgan E. Satışa sunulan gıda örneklerinden izole edilen *Salmonella* suşlarının çoklu antibiyotik dirençliliğinin araştırılması [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2015.
16. İset Ş. Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve elektron mikroskopik tekniklerle değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi, 2016.
17. Cahill SM, Wachsmuth IK, Costarrica Mde L, Ben Embarek PK. Powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. Clin Infect Dis. 2008;46(2):268-73. <https://doi.org/10.1086/524737>
18. Genç E. Bebek ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdalarında mikrobiyolojik kalitenin araştırılması [Yüksek Lisans tezi]. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, 2019.
19. Yao K, N'guessana KF, Zinzendorf NY, et al. Isolation and characterization of *Cronobacter* spp. from indigenous infant flours sold in public health care centres with in Abidjan, Côte d'Ivoire. Food Control. 2016;62:224-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.041>
20. Mutlu N. Çevresel örneklerden *Listeria monocytogenes*'e özgü faj izolasyonu ve genotipik karakterizasyonu [Doktora tezi]. Kars: Kafkas Üniversitesi, 2015.
21. Abdünnur V. İstanbul'da satışa sunulan dondurmaların *Listeria monocytogenes* ve *Enterobacteriaceae* varlığı yönünden incelenmesi [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: Aydın Üniversitesi, 2016.
22. Kevenk OT. Süt ve ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'in insidensi, serotiplendirilmesi ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi [Doktora tezi]. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2014.
23. Strydom A, Cawthorn DM, Cameron M, Witthuhn RC. Species of *Cronobacter* - a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. Int Dairy J. 2012;27(1-2):3-12. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.06.005>
24. Song X, Shukla S, Kim M. Detection of *Cronobacter* species in powdered infant formula using immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay. Food Microbiol. 2018;72:23-30. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.002>
25. Polat G, Halkman K. Bebek mamalarında *Enterobacter sakazakii* ve önemi. Gıda. 2007;32(3):151-61.
26. Doğangün E, Uylaşer V. *Cronobacter sakazakii*'nin gıda güvenliği açısından önemi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2016;30(2):91-100.

27. Chap J, Jackson P, Siqueira R, et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol.* 2009;36(2):185-8.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.005>
28. Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, Jaradat Z, Al- Zuby M. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* spp. from food and food production environments. *Food Control.* 2007;18(10):1241-5.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.020>
29. Iversen C, Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula and related products. *Food Microbiol.* 2004;21(6):771-7.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.009>
30. Torlak E. Gıda mikrobiyolojisinde *Enterobacteriaceae* üyeleri için kromojenik ve florojenik besiyerleri. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2011;68(1):49-58.
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2011.69077>
31. Akkaya L, Alişarlı M, Kara R, Telli R. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan çiğ süt ve peynirlerde *E. coli O157:H7* varlığının belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2007;18(1):1-5.
32. Çetingürbüz B. Hazır toz bebek mamaları ve çiğ sütlerde *Enterobacter sakazakii*'nin bulunma sıklığı [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2013.
33. Kim SA, Oh SW, Lee YM, et al. Microbial contamination of food products consumed by infants and babies in Korea. *Lett Appl Microbiol.* 2011;53(5):532-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03142.x>
34. Rahimi E, Abdos F, Momtaz H, Baghbadorani ZT, Jalali M. *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. *Sci World J.* 2013;1-5.
<https://doi.org/10.1155/2013/292571>
35. Aksu H. Ülkemizde tüketime sunulan hazır gıdalarda *Bacillus cereus*'ün varlığı ve önemi [Doktora Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 1994.
36. Çöl BG. Çeşitli gıdalarda *Bacillus cereus* toksinlerinin varlığı ve tiplendirilmesi [Doktora tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2014.
37. Tektemur A. Pastörize sütlerde *Bacillus cereus* varlığının tespiti üzerine bir araştırma [Yüksek lisans tezi]. Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2010.
38. Köksal Çakırlar F, Gönüllü N, Çelik Ş, Habip Z, Tüysüz G, Kiraz N. Nöroblastom tanılı hastada katater ilişkili *Bacillus cereus* bakteriyemisi. *JAREM* 2015;5(2):75-7.
<https://doi.org/10.5152/jarem.2015.612>
39. Rowan NJ, Anderson JG, Anderton A. Bacteriological quality of infant milk formulae examined under a variety of preparation and storage conditions. *J Food Prot.* 1997;60(9):1089-94.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.9.1089>
40. Shadlia-Matug M, Aidoo KE, Candlish AA, Elgerbi AM. Evaluation of some antibiotics against pathogenic bacteria isolated from infant foods in North Africa. *The Open Food Science Journal.* 2008;2:95-101.
<https://doi.org/10.2174/1874256400802010095>
41. Küçükçetin A, Milci S. *Staphylococcus aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda.* 2008;33(3):129-35.
42. Akıncı G. Levobupivakainin *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkinliğinin araştırılması [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2011.
43. Umoh VJ, Obawede KS, Umoh JU. Contamination of infant powdered milk in use with enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.* 1985;2(4):255-61.
44. Wang X, Meng J, Zhang J, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. *Int J Food Microbiol.* 2012;153(1-2):142-7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.030>
45. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1989-92.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00632-07>
46. AbdAlhussen LS, Darweesh MF. Prevalence and antibiotic susceptibility patterns of *Pantoea* spp. isolated from clinical and environmental sources in Iraq. *Int J ChemTech Res.* 2016;9(8):430-7.
47. Siwakoti S, Sah R, Rajbhandari RS, Khanal B. *Pantoea agglomerans* infections in children: report of two cases. *Case Rep Pediatr.* 2018;2018:4158734.
<https://doi.org/10.1155/2018/4158734>
48. Sani AN, Yi LY. *Enterobacteriaceae, Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* and microbial population in infant formula products in the Malaysian market. *Sains Malaysiana.* 2011;40(4):345-51.
49. Estuningsih S, Kress C, Hassan AA, Akineden O, Schneider E, Usleber E. *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *J Food Prot.* 2006;69(12):3013-7.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.12.3013>
50. Henson SP, Boinett CJ, Ellington MJ, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* invasive infections over a decade at Kilifi county hospital in Kenya. *Int J Med Microbiol.* 2017;307(7):422-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.006>
51. Nazik S, Kandilcik H, Şahin AR, Kahraman H, Ateş S. Akciğer abseli bir olgunun değerlendirilmesi. *Balikesir Med J.* 2018;2(3):165-9.
52. Baylis C, Uyttendaele M, Joosten H, Davies A. The *Enterobacteriaceae* and their significance to the food industry. *International Life Sciences Institute (ILSI)*

- Report. Commissioned by the ILSI Europe Emerging Microbiological Issues Task Force. Belgium; 2011.
53. Jain S, Arora S, Saha R, Kaur IR. *Serratia plymuthica*: a community - acquired uropathogen. Indian J Med Sci. 2017;69(1):31-2.
<https://doi.org/10.18203/issn.0019-5359.IndianJMedSci20170488>
54. Van Houdt R, Moons P, Jansen A, Vanoirbeek K, Michiels WC. Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm - forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. FEMS Microbiol Lett. 2005;246(2):265-72.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.016>
55. Koskinen R, Ali-Vehmas T, Kampfer P, et al. Characterization of *Sphingomonas* isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems. J Appl Microbiol. 2000;89(4):687-96.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01167.x>
56. Bulut C, Yetkin MA, Koruk ST, Erdinç FŞ, Karakoç EA. *Sphingomonas paucimobilis*: nadir bir hastane kaynaklı bakteriyemi etkeni. Mikrobiyol Bul. 2008;42(4): 685-8.
57. Borsa BA, Aldağ ME, Tunalı B, Dinç U, Güngördü Dalar Z, Özalp VC. Nadir görülen fırsatçı patojen *Bacillus pumilus*'un neden olduğu bir sepsis olgusu. Mikrobiyol Bul. 2016;50(3):466-70.
<https://doi.org/10.5578/mb.27575>
58. Shivamurthy VM, Gantt S, Reilly C, Tilley P, Guzman J, Tucker L. *Bacillus pumilus* septic arthritis in a healthy child. Canadian J Infect Dis Med Microbiol. 2016;2016;3265037.
<https://doi.org/10.1155/2016/3265037>
59. Korukluoğlu G, Zarakolu P, Güvener E. *Staphylococcus epidermidis* identifikasyonunda desferrioksamin duyarlılığının yeri. 27. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 7-10 Mayıs 1996, Antalya; 1996.
60. Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, et al. Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. PLoS ONE. 2013;8(4):e61161.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061161>
61. Reid KC, Cockeril III FR, Patel R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. Clin Infect Dis. 2001;32(11): 1540-6.
<https://doi.org/10.1086/320542>

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Türlerinin Eşey Tipi (MTL) Genotiplerinin Belirlenmesi

Identification of The Mating Type (MTL) Genotypes of Clinical *Candida parapsilosis* Complex Species isolated from Blood Cultures

Banu Metin*[©], Melike Yaşar**[©], Tuğrul Hoşbul***[©], Aylin Döğen****[©]
Süleyha Hilmioğlu Polat**[©], Macit İlkit*****[©]

*İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye
**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
***Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
****Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye
*****Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

Atf/Cite as: Metin B, Yaşar M, Döğen A, Hilmioğlu Polat S, İlkit M. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida parapsilosis* kompleks türlerinin eşey tipi (MTL) genotiplerinin belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):11-4.

Öz

Amaç: *Candida parapsilosis*, sistemik kandidoz etkenleri arasında *Candida albicans*'tan sonra en sık rastlanan *Candida* türlerinden biridir. *Candida* türlerinde eşey tipinin belirlenmesi ve eşeyli üremenin gerçekleştirilmesi, eşey tipi (MTL) gen bölgesi kontrolünde gerçekleşir. Bu bölge, iki farklı eşey tipinde (**a** ve **α**) tamamen farklı dizilimlerde olup idiomorf olarak adlandırılır. *MTLa* idiomorfu **a1** ve **a2** transkripsiyon faktörlerini kodlarken, *MTLa*, **a1** ve **a2** proteinlerini kodlar. Bu genler haricinde her iki idiomorfta da eşeyli üreme ile ilgili işlevleri bilinmeyen **PAB**, **OBP** ve **PIK** genlerinin **a** ya da **α** versiyonları vardır. *Candida parapsilosis* ve yakın ilişkili *Candida orthopsilosis* ile *Candida metapsilosis* türlerinde ise, bugüne kadar eşeyli üreme döngüsüne bugüne kadar rastlanmamıştır. Gerçekleştirilen incelemelerde, *C. orthopsilosis*'in *MTLa* ve *MTLa* homozigot ve *MTLa/MTLa* heterozigot genotiplerini içeren karışık bir popülasyon yapısına sahip olduğu, *C. metapsilosis* izolatlarının çoğunluğunun ise *MTLa/MTLa* heterozigot olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, şimdiki kadar incelenen *C. parapsilosis* izolatlarının hepsinin tek bir eşey tipinde (*MTLa*) olduğu görülmüştür.

Yöntem: Sunulan çalışmada, Türkiye kaynaklı *C. parapsilosis* kökenlerinin MTL genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu amaçla 167 kan izolatu incelenmiştir. ITS bölgesinin PCR'da çoğaltılarak sekanslanması ile *C. parapsilosis* olarak tanımlanan izolatlar, *MTLa1*, *MTLa2*, *MTLa1* ve *MTLa2* genleri yönünden taranmıştır.

Bulgular: PCR sonucunda yalnızca *MTLa1* ve *MTLa2* genlerine rastlanmıştır; dolayısıyla tüm izolatların *MTLa* genotipine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bulgular önceki çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, *C. parapsilosis*'in *MTLa* eşey tipinin zaman içerisinde yok olduğu veya henüz araştırılmamış coğrafi bölgelerde varlığını sürdüreceği şekilde seyrek olduğu sonucuna varılmıştır.

Ahtar kelimeler: *Candida parapsilosis*, MTL lokus, *MTLa* idiomorf

ABSTRACT

Objective: *Candida parapsilosis* is one of the most common species after *Candida albicans* among the causative factors of systemic candidosis. In *Candida* species, determination of the cell identity and the sexual reproduction process take place under the control of the mating type (*MTLa*) locus. This region has completely different sequences in two different mating types (**a** and **α**) and is called an idiomorph. While the *MTLa* idiomorph encodes the transcription factors **a1** and **a2**, *MTLa* encodes **a1** and **a2** proteins. Apart from these genes, both idiomorphs have a or α versions of **PAB**, **OBP**, and **PIK** genes, whose functions in sexual reproduction are unknown. On the other hand, up to now neither *Candida parapsilosis* nor the closely related species *Candida orthopsilosis* or *Candida metapsilosis* has been reported to have sexual cycles. While *C. orthopsilosis* was found to have a mixed population structure harboring *MTLa* and *MTLa* homozygous and *MTLa/MTLa* heterozygous genotypes in realized studies, the majority of *C. metapsilosis* isolates were *MTLa/MTLa* heterozygotes. Nevertheless, all *C. parapsilosis* isolates analyzed were found to be of a single mating type (*MTLa*).

Method: This study was aimed to determine the MTL genotypes of *C. parapsilosis* isolates of Turkey origin, and 167 blood isolates were used for this purpose. The isolates identified as *C. parapsilosis* by PCR-amplifying and sequencing the ITS region were screened for *MTLa1*, *MTLa2*, *MTLa1* and *MTLa2* genes.

Results: Only *MTLa1* and *MTLa2* genes were detected in PCR; therefore, all isolates were determined to have the *MTLa* genotype.

Conclusion: When the results are assessed with previous findings, it could be inferred that the *MTLa* mating type of *C. parapsilosis* has been lost or extremely rare in yet unanalyzed geographical regions.

Keywords: *Candida parapsilosis*, MTL locus, *MTLa* idiomorph

Alındığı tarih / Received:
11.06.2020 / 11.June.2020

Kabul tarihi / Accepted:
08.10.2020 / 08.October.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

B. Metin 0000-0002-3203-0058
M. Yaşar 0000-0001-8913-2314
T. Hoşbul 0000-0002-0150-4417
A. Döğen 0000-0002-0388-306X
S. Hilmioğlu Polat 0000-0001-8850-2715
M. İlkit 0000-0002-1174-4182

✉ aylinats@mersin.edu.tr

GİRİŞ

Candida türleri yoğun bakım ünitelerinde rastlanan sistemik mantar enfeksiyonlarının tüm dünyada en sık nedenidir⁽¹⁾. *Candida albicans*'tan sonra en sık rastlanan türlerden birisi de *Candida parapsilosis*'tir⁽²⁾. Her ne kadar sıklıkla *C. albicans*'dan daha az virülen olarak değerlendirilse de, 1990'lardan sonra olgu sayısı en çok artış gösteren *Candida* türüdür⁽³⁾. *C. albicans* ve *Candida tropicalis* gibi zorunlu insan patojeni değildir; ev hayvanları, böcekler, toprak, su ve ev aletleri gibi başka kaynaklardan da izole edildiği bildirilmiştir⁽³⁻⁵⁾. Sağlıklı insanların mukoza yüzeyleri, deri ve tırnaklarından da izole ediliyor olması normal vücut florasının bir parçası olduğunu göstermektedir⁽⁶⁾.

Moleküler analizler, *C. parapsilosis*'in birbiriyle yakın ilişkili bir türler kompleksi olduğunu göstermiş ve bu kompleksteki türler *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* ve *Candida metapsilosis* olarak tanımlanmıştır⁽⁷⁾. Ancak, klinik izolatların çoğunluğu *C. parapsilosis* oluşturmaktadır^(3,6).

Candida türleri, mantarlar içerisinde en çok inceleme yapılan şube olan Ascomycota'nın Saccharomycotina alt şubesine dâhildirler⁽⁸⁾. Bu alt şube içerisinde hücre kimliği eşey tipi lokusu (mating type locus, *MAT* veya *MTL*) tarafından belirlenir. Bu lokus birbiri ile dizilimleri tamamen farklı olan α veya α idiomorfalarını içerir ve eşeyli üreme, α hücreler ile α hücreler arasında olur^(8,9). *Candida albicans*'da *MTLa*, bir homeodomain transkripsiyon faktörü olan *a1* proteinini ve HMG (high mobility group) domaini içeren *a2* proteinini kodlayan iki gen içerir; *MTLa* ise $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ proteinlerini kodlar⁽¹⁰⁾. Bu anahtar genler haricinde her iki idiomorf da eşeyli üreme ile ilgisi tam olarak bilinmeyen *PAB*, *OBP* ve *PIK* genlerinin α ya da α şekillerini içerirler^(11,12). *C. albicans* istisnai durumlar haricinde, diploid ve hem *MTLa*, hem de *MTLa*'yı içerecek şekilde heterozigot olarak bulunur. Belirli şartlar altında indüklenebilen homozigot *a/a* ve α/α *C. albicans* hücreleri birleşerek tetraploid bir yapı oluşturduktan sonra rastgele kromozom kaybı ile diploid veya anöplid yapıya dönüşebilirler ve bu şekilde paraseksüel olarak adlandırılan bir üreme döngüsünü tamamlayabilirler⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Candida parapsilosis, *C. albicans* gibi diploid bir mikroorganizmadır⁽¹¹⁾. Bugüne kadar, eşeyli üremesinin olduğuna dair bir bulgu bildirilmemiştir. Ayrıca, *C. albicans*'ın aksine, şimdiye kadar analiz edilen izolatların hepsi *MTLa/MTLa* homozigot olup *MTLa* idiomorfuna rastlanmamıştır^(11,15-18). Bu çalışmada, 167 Türkiye kaynaklı *C. parapsilosis* izolatının *MTL* genotiplerinin ülkemizde ilk kez belirlenmesi, araştırma verilerinin literatür verileri ile karşılaştırılması ve sonuçların tartışılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

***Candida parapsilosis* izolatları:** Çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 2006-2014 yılları arasında stoklanan 167 *C. parapsilosis* kan izolatu kullanıldı. Çalışma öncesi *C. parapsilosis* tanılı izolatlar YEPD (maya ekstraktı pepton dekstroz agar; Difco, Detroit, MI, ABD) besiyerinde 37°C'de 2-3 gün süre ile inkübe edildi ve saf üreme varlığı kontrol edildi. Jerm tüp testi ve mısır-unu Tween 80 agar morfolojileri yanında tüm izolatlar ITS (internal transcribed spacer) bölgeleri sekanslanarak identifiye edildi. Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'na onaylandı.

DNA izolasyonu ve PCR: Genomik DNA izolasyonu, YEPD besiyerinde 3 günlük inkübasyon sonunda üreyen *C. parapsilosis* kolonileri doğrudan petriden alınarak ve "MasterPure Yeast DNA Purification Kit" (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, ABD) kullanılarak kit kılavuzunda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonları PTC-200 ısı döngü cihazı (BioRad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon 25 mL'lik hacimde, 2.5 mL 10' "Ex Taq buffer", 0.125 mL "ExTaq polymerase" (TaKaRa, Shiga, Japonya), her bir primer 10 pM, nükleotitler (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) 2 mM olacak şekilde ve 300 ng DNA kullanılarak gerçekleştirildi. DNAsız kontrol olarak DNA yerine su kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler Döğen ve ark.⁽¹⁶⁾ tarafından tanımlandığı şekilde tasarlandı. PCR amplifikasyonu 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyon işleminden sonra 94°C'de 1 dakika denatüras-

yon, 57°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzamadan oluşan 36 döngü ardından 72°C'de 10 dakika son uzama yapılarak yürütüldü. PCR ürünleri %1 agaroz içeren jel kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

İzolatların ITS bölgeleri PCR'da çoğaltılarak sekanslandı ve *C. parapsilosis* tür tanısı tüm izolatlar için doğrulandı. PCR sonucunda tüm izolatlarda yalnızca *MTLa1* ve *MTLa2* genlerine rastlandı, *MTLa1* veya *MTLa2* ürünü elde edilmedi. Tüm izolatların *MTLa* genotipine sahip olduğu belirlendi.

TARTIŞMA

Candida parapsilosis, filogenetik olarak, *C. albicans*'ı da içeren CTG grubunda (translasyonda CTG kodonunu lösün yerine serin olarak işleyen mikro-organizmalar) yer almaktadır⁽¹¹⁾. Bu gruptaki maya mantarları kaba bir sınıflandırma ile diploid ve haploid olarak iki gruba ayrılırlar. Haploid grupta, *Candida lusitanae* ve *Candida guilliermondii* gibi eşeyli üreme yapabilen türler bulunmaktadır. Diploid grupta ise *C. albicans* ve onunla yakın ilişkili *Candida dubliniensis* ve *C. tropicalis* ile *C. parapsilosis* türler kompleksi ve *Lodderomyces elongisporus* yer almaktadır⁽¹¹⁾. *C. albicans*, uzun yıllar boyunca yalnızca eşeysiz üreyebilen bir maya olarak kabul edilmiş; ancak, yakın zamanda paraseksüel olarak adlandırılan bir üreme döngüsünün de olduğu görülmüştür^(12,13). Diploid *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis*'in eşeyli üremelerinin olduğuna dair bir bulguya ise şimdiye kadar rastlanmamıştır⁽¹⁵⁾. İlk çalışmalarda, *L. elongisporus*'un homotallik, yani kendi kendini döleyebilen, bir üreme şekline sahip olduğu ve askus ve askospor oluşturduğu tanımlanmış, ancak detaylı bilgi verilmemiştir⁽¹⁹⁾.

Candida parapsilosis 2005'ten önce moleküler analizlerde farklılık arz eden grup I, II, ve III olarak belirtilirken, daha sonra grup II *C. orthopsilosis*, grup III ise *C. metapsilosis* olarak adlandırılmıştır^(3,7,20). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *C. parapsilosis*'in yalnızca *MTLa/MTLa* homozigot suşlarına rastlanmıştır^(11,15-17). Buna karşılık, *C. orthopsilosis*'in, *MTLa/MTLa* heterozigot, *MTLa/MTLa* ve *MTLa/MTLa* homozigot

yapılarında karışık bir popülasyona sahip olduğu belirlenmiştir⁽¹⁵⁾. Prysycz ve ark.'nın⁽²¹⁾ çalışmasında, 11 *C. metapsilosis* izolatının 10'unun *MTLa/MTLa* heterozigot bir yapıda bulunduğu, α idiomorfunun $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ ile *PAP α* , *PIK α* ve *OBP α* genlerini içerdiği, **a** idiomorfunun ise **a1** ve **a2** genleri ile $\alpha 2$ ve *OBP α* ile *PIK* geninin bir kısmı α , bir kısmı **a** olacak şekilde hibrit bir şeklini içerecek şekilde bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.

Candida parapsilosis ile ilgili yapılan bir çalışmada, Portekiz kaynaklı 114 izolat ve çoğunluğu Macaristan kaynaklı 66 *C. parapsilosis* kökeni incelenmiş ve hepsi *MTLa/MTLa* olarak belirlenmiştir⁽¹⁵⁾. Porto Riko, ABD, Japonya, Belçika ve İngiltere'den sekiz *C. parapsilosis* izolatı içeren başka bir çalışmada da yine tüm izolatların *MTLa* genotipine sahip olduğu görülmüştür⁽¹⁷⁾. ABD, Yeni Zelanda, Norveç, Porto Riko, Şili, Zimbabve ve İtalya kaynaklı sekiz *C. parapsilosis* izolatı içeren başka bir çalışmada da yine yalnızca *MTLa* genotipine rastlanmıştır⁽¹⁶⁾. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da 167 Türkiye izolatı incelenmiş, ancak yalnızca *MTLa* genotipi belirlenmiştir. Bu durum, *C. parapsilosis*'in *MTLa* eşey tipinin zaman içerisinde yok olmuş olabileceğini veya çok seyrek olup rastlanmadığına işaret etmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, Avrupa dışında çalışılan izolatlar sınırlı sayıdadır. **Bu durum, diğer kıtalardan da yapılacak global örnekleme ile daha sağlıklı sonuçların elde edileceğini göstermiştir.**

Teşekkür

Sunulan çalışmaya ilişkin eşey tip gen bölgeleri Duke Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji ve Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Eşsiz katkı ve yardımlarından ötürü Prof. Dr. Joseph Heitman'a teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (06/02/2020-E.40067).

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Finans bilgisi bulunmamaktadır.

Ethics Committee Approval: Approval was obtained from Ege University Faculty of Medicine Medical Research Ethics Committee (06/02/2020-E.40067).

Conflict of Interest: The authors did not declare a conflict of interest related to this article.

Funding: There is no financial information.

KAYNAKLAR

1. Tabah A, Koulenti D, Laupland K, et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EURO-BACT International Cohort Study. *Intensive Care Med.* 2012;38(12):1930-45. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2695-9>
2. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, et al. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2019;20;32(2):e00111-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
3. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):606-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
4. Döğen A, Sav H, Gonca S, et al. *Candida parapsilosis* in domestic laundry machines. *Med Mycol.* 2017;55(8):813-9. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx008>
5. Fell JW, Meyer SA. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl.* 1967;32(3):177-93. <https://doi.org/10.1007/BF02049795>
6. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: A review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):283-309. <https://doi.org/10.3109/10408410903213393>
7. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):284-92. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
8. Wolfe KH, Butler G. Evolution of mating in the Saccharomycotina. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71(1):197-214. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093403>
9. Bennett RJ, Turgeon BG. Fungal sex: The Ascomycota. *Microbiol Spectr.* 2016;4(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0005-2016>
10. Butler G. Fungal sex and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan 1;23(1):140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-09>
11. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459(7247):657-62. <https://doi.org/10.1038/nature08064>
12. Hull CM, Raisner RM, Johnson AD. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 2000;289(5477):307-10. <https://doi.org/10.1126/science.289.5477.307>
13. Magee BB, Magee PT. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLα* strains. *Science.* 2000;289(5477):310-3. <https://doi.org/10.1126/science.289.5477.310>
14. Bennett RJ, Johnson AD. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* 2003;22(10):2505-15. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg235>
15. Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryot Cell.* 2011;10(4):578-87. <https://doi.org/10.1128/EC.00276-10>
16. Döğen A, Metin B, Ilkit M, de Hoog GS, Heitman J. *MTL* genotypes, phenotypic switching, and susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* species group compared to *Lodderomyces elongisporus*. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182653>
17. Logue ME, Wong S, Wolfe KH, Butler G. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective *MTLa1* allele at its mating type locus. *Eukaryot Cell.* 2005;4(6):1009-17. <https://doi.org/10.1128/EC.4.6.1009-1017.2005>
18. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):374-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01790-07>
19. van der Walt JP. *Lodderomyces*, a new genus of the Saccharomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1966;32(1):1-5. <https://doi.org/10.1007/BF02097439>
20. Cebeci Güler N, Tosun İ, Bayramoğlu G, Buruk K, Aydın F. Klinik örneklerden izole edilen *Candida parapsilosis* kompleks türlerinin (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*) genotipik olarak tanımlanması ve dağılımlarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(4):723-8.
21. Prysacz LP, Németh T, Saus E, et al. The genomic aftermath of hybridization in the opportunistic pathogen *Candida metapsilosis*. *PLoS Genet.* 2015;11(10):e1005626. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005626>

Staphylococcus aureus'un Onbeş Yılda Metisilin Direnç ve Antibiyogram Direnç Profilinin ve Görülme Sıklığının Değişimi

Change of the Frequency of Methicillin Resistance and Antibioqram Resistance Profile of Staphylococcus aureus within a Period of 15 Years

Kamuran Şanlı*[©], Selen Zeliha Mart Kömürçü*[©], Nilgün Kansak**[©], Rıza Adaleti**[©]

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kanuni Sultan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye

**Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye

Atf/Cite as: Şanlı K, Mart Kömürçü SZ, Kansak N, Adaleti R. *Staphylococcus aureus*'un onbeş yılda metisilin direnç ve antibiyogram direnç profilinin ve görülme sıklığının değişimi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):15-22.

öz

Amaç: Bu retrospektif çalışmanın amacı, 2004 ve 2019 yılları arasında toplum kaynaklı (TK) ve hastane kaynaklı (HK) metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* (MRSA, MSSA) suşlarının oran ve antimikrobiyal direnç profilinin değerlendirilmesidir.

Yöntem: Araştırma kapsamında 2004 yılına ait 210 ve 2019 yılına ait 401 *Staphylococcus aureus* suşunda iki ayrı zaman dilimi araştırma verileri kullanılarak, toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı MRSA ve MSSA oranı ve antimikrobiyal direnç profilinin zaman içerisindeki değişimi incelendi.

Bulgular: 2004 yılında toplum kaynaklı MRSA (%32.4) ve MSSA (%67.6) oranları ile 2019 yıllarındaki toplum kaynaklı MRSA (%31.6) ve MSSA (%68.4) oranları arasında anlamlı değişim gözlenmezken, HK-MRSA'nın 2004 yılında %56.1, 2019 yılı için %30.7 oranında azaldığı, 2004 yılında %43.9 olan HK-MSSA oranının, 2019 yılında %69.3 ile arttığı görüldü. MRSA'larda vankomisin ve teikoplanine karşı direnç gelişmediği gözlenmiştir. Toplum kaynaklı MRSA'ların siprofloksasin, levofloksasin, klindamisin ve gentamisin direnci azalmıştır. Toplum kaynaklı MSSA'ların penisilin direnci artarken, gentamisin direnci azalmıştır. Hastane kaynaklı MRSA'larda, siprofloksasin, levofloksasin, eritromisin, klindamisin ve gentamisin direnci düşüş gösterirken, MSSA'larda da fusidik asit direnci artmış, siprofloksasin, trimetoprim/sülfametoksazol ve eritromisin ve gentamisin direnci azalmıştır.

Sonuç: Hastane kaynaklı MRSA oranlarının on beş yıllık zaman diliminde azaldığı saptanmıştır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve MSSA'da vankomisin ve teikoplanin direnci belirlenmemiştir. Toplum kaynaklı MRSA ve HK-MRSA'nın siprofloksasin, levofloksasin, klindamisin, gentamisin direnci azalmıştır. Hastanemizde enfeksiyon kontrol ve kısıtlı antibiyogram bildiriminin metisiline dirençli *S. aureus* ve MSSA'nın oranı ve antimikrobiyal direnç profilinin yakından izlenmesi bu enfeksiyonların kontrolünün başarısı açısından son derece önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, antibiyotik direnci

ABSTRACT

Objective: The aim of this retrospective study was to evaluate the rate and antimicrobial resistance profile of community-acquired (CA) and hospital-acquired (HA) methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* (MRSA, MSSA) strains between 2004 and 2019.

Method: Within the scope of the research, the rate of MRSA and MSSA and the change in antimicrobial resistance profile over time were investigated using two research data of 210 *Staphylococcus aureus* strains isolated in 2004, and 401 in 2019.

Results: While any significant change was not seen in the rates of CA-MRSA (32.4%) and CA-MSSA (67.6%) in 2004, and of CA-MRSA (31.6%) and CA-MSSA (68.4%) in 2019, the prevalence of HA-MRSA decreased by 56.1% in 2004 and 30.7% in 2019 and of HA-MSSA increased by 43.9% in 2004 and 69.3% in 2019. No resistance to vancomycin and teicoplanin was observed in MRSA strains. Resistance of CA-MRSA against ciprofloxacin, levofloxacin, clindamycin and gentamicin decreased. In CA-MSSA an increase of penicillin resistance as well as a decrease in gentamicin resistance was observed. In resistance of HA-MRSA against ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin, clindamycin, gentamicin decreased. HA-Resistance of MSSA against fusidic acid increased and against ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole and erythromycin resistance decreased.

Conclusion: It was found that the rate of HA-MRSA decreased during the given period of 15 years. Vancomycin or teicoplanin resistance was not observed in MRSA and MSSA. While against ciprofloxacin, levofloxacin, clindamycin, gentamicin decreased in both CA-MRSA and HA-MRSA. A closer follow-up of the prevalence and antimicrobial resistance profiles of these strains is of utmost importance for the successful control of the infections caused by MRSA and MSSA.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, antibiotic resistance

Alındığı tarih / Received:
04.08.2020 / 04.August.2020

Kabul tarihi / Accepted:
12.10.2020 / 12.October.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

K. Şanlı 0000-0003-0814-5637
S.Z. Mart Kömürçü 0000-0001-7500-0783
N. Kansak 0000-0002-1117-3906
R. Adaleti 0000-0001-9576-6794

✉ dr.kamuransanlı@gmail.com

GİRİŞ

Antimikrobiyal ilaçların gereksiz ve yanlış kullanılması kazanılmış antimikrobiyal direnç ile (genellikle mutasyon veya direnç geni alımı ile) sonuçlanmaktadır. Bunun sonucunda standart tedaviler etkisiz hâle gelmekte ve diğer insanlara yayılabilen tedaviye dirençli enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır⁽¹⁾. *Staphylococcus aureus* toplumun %20-40'ında nazal florada bulunan, hem toplumda hem de hastane kaynaklı ortaya çıkan enfeksiyonların önemli bir nedenidir ve dirençli olduğu antimikrobiyal ajanların sayısı giderek artmaktadır^(2,3). *S. aureus* değişik antibiyotiklere karşı farklı yollardan dirençli hâle gelebilir. Genetik olarak çok yönlü olmaları, bu direncin alt yapısının oluşumunda önemli rol oynar. Antibiyotik çağındaki adaptasyonunun bir sonucu olarak, *S. aureus* evrim geçirerek, tedavide kullanılan birçok antibiyotiğe direnç kazanmıştır. *S. aureus*'un penisilin direnci, penisilin kullanılmaya başladıktan bir yıl sonra (1942) ortaya çıkmıştır ve 1950'lerde büyük hastanelerde *S. aureus* suşlarının yarısı veya daha fazlası penisiline dirençli hâle gelmiştir⁽⁴⁾. Günümüzde dünya genelinde klinik *S. aureus* suşları % 90-95'i penisiline dirençlidir⁽⁵⁾. Penisiline ek olarak, *S. aureus* eritromisin, streptomisin ve tetrasiklinler gibi başka antibiyotiklere karşı da direnç geliştirebilmiştir. Bu süreçte, metisilin, penisilin direncinin üstesinden gelmek için 1959'da tanıtılmıştır. Ancak, iki yıl sonra metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ortaya çıkmış ve metisilin direncinin mekanizması 1981'de tanımlanmıştır⁽⁶⁾. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), *mec A* geni taşıyan stafilokokal kaset kromozom *mec (SCC mec)* kazanımı yoluyla metisiline duyarlı *S. aureus*'tan (MSSA) evrilir. *mec* tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç kazandıran penisilin bağlayıcı proteini (PBP2a) kodlayan bir genidir⁽⁴⁾. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008 yılından sonra, *mecA* genine bağlı metisilin direncini saptamada tarama testi olarak sefoksitin disk difüzyon testininin kullanılmasını önermektedir⁽⁷⁾.

MRSA enfeksiyonu, dünyanın birçok ülkesinde önemli bir halk sağlığı sorunudur. MRSA toplum ve hastane

kaynaklı enfeksiyonların önemli nedenlerinden biri haline gelmiştir. Bakteriyemi, pnömoni, menenjit, endokardit, cilt ve yumuşak doku, cerrahi alan, idrar yolu, kemik ve eklem enfeksiyonları ve toksik şok sendromu dâhil olmak üzere çok çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır⁽⁸⁾. MRSA geleneksel olarak sağlık bakımı ile ilişkili, hastane kaynaklı (HK-MRSA) ve toplum kaynaklı (TK-MRSA) olarak sınıflandırılmaktadır⁽⁹⁾. Hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarında genellikle, yakın zamanda hastaneye yatış, diyaliz, cerrahi, uzun süreli sağlık kuruluşunda kalma ve komorbidite öyküsünün enfeksiyonların ortaya çıkmasına zemin hazırladığı bildirilmektedir. Toplum kaynaklı MRSA salgınları, bakım merkezleri, azınlık nüfusları ve kontakt spor yapan sporcular dâhil olmak üzere damar içi uyuşturucu kullananlar, askeri personel ve hapishanelerde yaşayan bireylerde meydana gelebilmektedir⁽¹⁰⁾. Metisiline dirençli *S. aureus* sıklığı son yıllarda değişim göstermektedir.

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)) verilerine göre 2000-2018 yılları arasındaki MRSA oranları incelendiğinde bazı ülkelerde ciddi düşüşler, bazılarında sabit bir trend bazılarında ise artış olduğu izlenmektedir⁽¹¹⁾. Hastane kaynaklı ve toplum kaynaklı MRSA ve MSSA'nın oranları ve antimikrobiyal direnç profilinin zaman içerisindeki değişimini Türkiye'de değerlendiren sınırlı sayıda araştırma vardır.

Bu çalışmanın amacı, 2004 ve 2019 yıllarında toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı MRSA ve MSSA oranı ve antimikrobiyal direnç profilinin değerlendirilerek 15 yıllık süreçte değişimin ortaya konmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma kapsamında 2004 ve 2019 yılında yapılan iki araştırma verileri kullanılarak, toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı MRSA ve MSSA oranı ve antimikrobiyal direnç profilinin zaman içerisindeki değişimi incelendi.

Antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde, 2004 yılında yapılan çalışmada çeşitli kliniklerden gönderilen materyallerden üretilen 210 *S. aureus* suşu incelemeye alınmıştır. Suşların identifikasyonunda Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testinde bir gece inkübe edilmiş saf kültürlerden alınan 0.5 McFarland bulanıklık standartlarında direkt koloni süspansiyonları hazırlanarak Mueller Hinton agar (Oxoid, Birleşik Krallık) besiyerine ekim yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılığı (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer yöntemiyle disk difüzyon çalışılarak yorumlanmıştır. Fusidik asid direnci Fransa Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin belirlediği kriterlere göre değerlendirilmiştir. Oksasilin (1µg; Oxoid, Birleşik Krallık) zon çapı ≤10 mm ise metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), zon çapı ≥13 mm ise metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak değerlendirilmiştir⁽¹²⁾. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923 kullanılmıştır.

2019 yılında yapılan çalışmada ise çeşitli kliniklerden gönderilen materyallerden üretilen 401 *S. aureus* suşunun tanımlanması konvansiyonel yöntemler ve Matris aracılı lazer dezorpsiyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry - MALDI TOF, bioMérieux, Fransa), antimikrobiyal duyarlılık testleri (Vitek-2, bioMérieux, Fransa) otomatize sistem ile yapılmıştır. Buradan elde edilen veriler Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)) kriterlerine göre değerlendirilmiştir⁽¹²⁾. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

Hastane enfeksiyonları hasta hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra ve taburculuğu takiben ilk 10 gün içinde gelişir. Ancak enfeksiyonun tipine göre bu tanımda bazı değişiklikler olabilir. Örneğin, cerrahi bir girişimi takiben ilk 30 gün içinde cerrahi yara bölgesinde gelişen enfeksiyonlar hastane enfeksiyonu olarak kabul edilir⁽¹³⁾. Çalışmamızda hastane kaynaklı *S. aureus* tanımı, hastaneye yatışından 48 saat sonra laboratuvarımıza gönderilen örneklerden üretilen

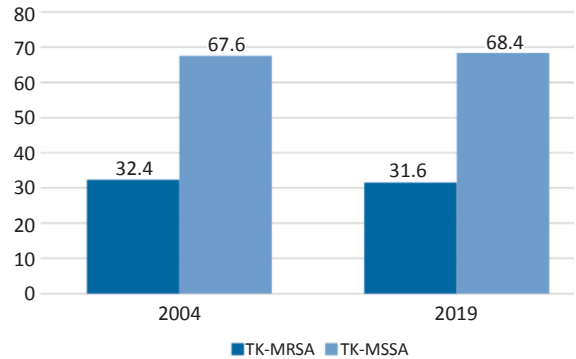
suşlar için kullanılmıştır.

Çalışmada *S. aureus* MRSA ve MSSA tanımları toplum kaynaklı (TK) ve hastane kaynaklı (HK) olarak farklı gruplarda sınıflandırılmıştır. Her bir grubun 2004 ve 2019 yılına ait görülme sıklığı ve antimikrobiyal direnç oranları karşılaştırılmıştır.

Araştırmada elde edilen veriler bilgisayar ortamında IBM SPSS (Ver 15.0) istatistik paket programı ile değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı verilerin değerlendirilmesinde sayı, yüzde kullanılmıştır. Yıllar arasındaki oranı ve direnç değişiminin analizinde ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada, 2004 ve 2019 yılları arasında toplum kaynaklı MRSA ve MSSA oranlarının anlamlı derecede değişim göstermediği gözlemlendi. Toplum kaynaklı MRSA suşlarının, 2004 ve 2019 yılları arasındaki değişimi Tablo 1 ve Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. TK-MRSA ve MSSA'ların zaman içerisindeki dağılımı.

Staphylococcus aureus suşlarının kaynak aldığı hasta profiline göre incelendiğinde ise hastane kaynaklı MRSA oranının %56.1'den %30.7'e düştüğü, MSSA oranının %43.9'dan %69.3'e yükseldiği ve bu değişimlerin anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$). Hastane kaynaklı MRSA ve MSSA suşlarının 2004 ve 2019 yılları arasındaki değişimi Tablo 2 ve Şekil 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Toplum kaynaklı MRSA ve MSSA suşlarının, 2004 ve 2019 yılları arasındaki değişimi.

	TK-MRSA n (%)	TK-MSSA n (%)	Toplam n (%)	p
2004	12 (32.4)	25 (67.6)	37 (100.0)	0.93
2019	31 (31.6)	67 (68.4)	98 (100.0)	

Tablo 2. Hastane kaynaklı MRSA ve MSSA suşlarının, 2004 ve 2019 yılları arasında değişimi.

	HK-MRSA n (%)	HK-MSSA n (%)	Toplam n (%)	p
2004	97 (56.1)	76 (43.9)	173 (100.0)	
2019	93 (30.7)	210 (69.3)	303 (100.0)	<0.001

Tablo 3. Toplum kaynaklı MRSA'ların 2004 ve 2019 yılları arasındaki antibiyotik direnç oranlarının değişim profili.

	TK-MRSA-2004 n (%)	TK-MRSA-2019 n (%)	p
Oksasilin/sefoksitin	12 (100.0)	31 (100.0)	*NS
Fusidik asit	1 (8.3)	5 (16.6)	0.51
Siprofloksasin	5 (41.6)	4 (12.9)	0.04
Levofloksasin	5 (41.6)	2 (6.4)	<0.01
Vankomisin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
Teikoplanin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
TMP/SXT*	2 (16.6)	2 (6.4)	0.30
Mupirosin	1 (8.3)	0 (0.0)	0.10
Penisilin	12 (100.0)	31 (100.0)	NS
Eritromisin	7 (58.3)	16 (51.3)	0.69
Klindamisin	5 (41.6)	3 (9.6)	0.02
Gentamisin	7 (58.3)	3 (9.6)	0.001
Toplam	12 (100.0)	31 (100.0)	

*NS: p değeri 1'e yakın (0.93)

*TMP/SXT: trimetoprim/sülfametaksazol

Toplum kaynaklı MRSA'ların fusidik asit, trimetoprim/sülfametoksazol, mupirosin, penisilin, eritromisin, direncinde incelenen zaman aralığında anlamlı bir değişim olmadığı gözlenirken, vankomisin ve teikoplanine karşı direnç gelişmediği gözlemlendi. On beş yıllık süreçte siprofloksasin, levofloksasin, klindamisin ve gentamisin direncinde anlamlı derecede azalma [sırası ile $p < (0.04), (0.01), (0.02), (0.001)$] olduğu saptandı. Toplum kaynaklı MRSA'ların on beş yıllık süreçte antibiyotik direnç oranlarının değişim profili Tablo 3'te verilmiştir.

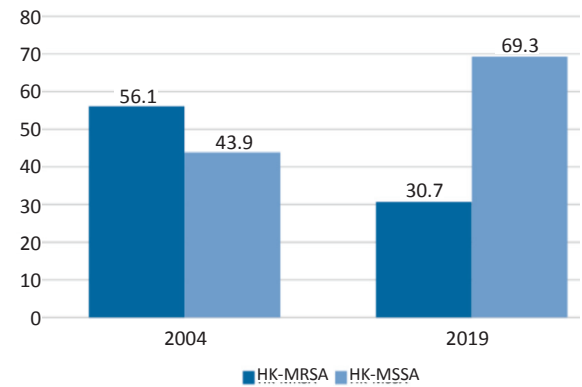
Toplum kaynaklı MSSA'ların on beş yıllık zaman diliminde, fusidik asit, siprofloksasin, levofloksasin, tri-

Tablo 4. Toplum kaynaklı MSSA'ların 2004 ve 2019 yılları arasındaki antibiyotik direnç oranlarının değişim profili.

	TK-MSSA-2004 n (%)	TK-MRSA-2019 n (%)	p
Fusidik asit	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
Siprofloksasin	4 (16.0)	4 (6.0)	0.13
Levofloksasin	1 (4.0)	2 (2.9)	0.81
Vankomisin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
Teikoplanin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
TMP/SXT*	1 (4.0)	1 (1.4)	0.46
Mupirosin	1 (4.0)	0 (0.0)	0.10
Penisilin	14 (56.0)	52 (77.6)	0.04
Eritromisin	5 (20.0)	8 (11.9)	0.32
Klindamisin	2 (8.0)	7 (10.4)	0.72
Gentamisin	5 (20.0)	1 (1.4)	0.001
Toplam	25 (100.0)	67 (100.0)	

*NS: p değeri 1'e yakın (0.93)

*TMP/SXT: trimetoprim/sülfametaksazol

**Şekil 2. HK-MRSA ve MSSA'ların yıllar içinde dağılımı.**

metoprim/sülfometoksazol, mupirosin, eritromisin, klindamisinine karşı gösterdiği dirençte anlamlı değişim olmadığı gözlemlendi. Toplum kaynaklı MSSA'ların penisilin direnci 2004 yılında %56 iken 2019 yılında %77.6 olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0.04$) olduğu saptanmıştır. Gentamisin direncinin 2004 yılı için %20, 2019 yılı için ise %1.4 ile anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Toplum kaynaklı MSSA'ların 2004 ve 2019 yılları arasındaki antibiyotik direnç oranlarının değişim profili Tablo 4'te verilmiştir.

Çalışmada, on beş yıllık zaman diliminde hastane kaynaklı MRSA'ların fusidik asit, trimetoprim/sülfa-

Tablo 5. Hastane kaynaklı MRSA'ların 2004 ve 2019 yılları arasındaki antibiyotik direnç oranlarının değişim profili.

	HK-MRSA 2004 n (%)	HK-MRSA 2019 n (%)	p
Oksasilin/sefoksitin	97 (100.0)	93 (100.0)	NS*
Fusidik asid	8 (8.2)	8 (8.6)	0.93
Siprofloksasin	85 (87.6)	14 (15.0)	<0.001
Levofloksasin	77 (79.3)	13 (13.9)	<0.001
Vankomisin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS*
Teikoplanin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS*
TMP/SXT*	16 (16.4)	10 (10.7)	0.25
Mupirosin	3 (3.0)	3 (3.2)	0.96
Penisilin	97 (100.0)	93 (100.0)	NS*
Eritromisin	71 (73.1)	46 (49.4)	0.001
Klindamisin	74 (76.2)	44 (47.3)	<0.001
Gentamisin	84 (86.5)	7 (7.5)	<0.001
Toplam	97 (100.0)	93 (100.0)	

*NS: p değeri 1'e yakın (0.93)

*TMP/SXT: trimetoprim/sülfametaksazol

metoksazol, mupirosin ve penisilin direncinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, vankomisin ve teikoplanine karşı dirençli olgu saptanmamıştır. Bu süreçte 2004 ve 2019 yılı için direnç oranları sırayla; siprofloksasin %87.6'dan %15'e, levofloksasin %79.3'ten %13.9'a, eritromisin %73.1'den %49.4'e, klindamisin %76.2'den %47.3'e ve gentamisin %86.5'ten %7.5'e anlamlı düşüş olduğu ($p \leq 0.001$) saptandı. Hastane kaynaklı MRSA'ların 2004 ve 2019 yılları arasındaki antibiyotik direnç oranlarının değişim profili Tablo 5'te verilmiştir.

Hastane kaynaklı MSSA için 2004 ve 2019 yılları arasında levofloksasin, mupirosin, penisilin, klindamisin direncinde anlamlı bir değişim gözlenmezken vankomisin ve teikoplanine direnç gelişmediği gözlemlendi. Buna ek olarak 2004 ve 2019 yılları arasında sırasıyla; siprofloksasin %23.6-%3.3, trimetoprim/sülfametoksazol %7.8-%0.5, eritromisin %21.0-%10.0 direncinde anlamlı düzeyde düşüş, [sırası ile $p < (0.001)$, (0.001), (0.01)] fusidik asidde ise artış görüldü ($p < 0.001$). Hastane kaynaklı MSSA için on beş yıllık zaman diliminde antibiyotik direnç oranlarının değişim profili Tablo 6'da verilmektedir.

TARTIŞMA

MRSA enfeksiyonlarının, çoklu ilaç direnci ve enfeksi-

Tablo 6. Hastane kaynaklı MSSA'ların 2004 ve 2019 yılları arasındaki antibiyotik direnç oranlarının değişim profili.

	HK-MRSA 2004 n (%)	HK-MRSA 2019 n (%)	p
Fusidik asid	2 (2.6)	7 (3.3)	<0.001
Siprofloksasin	18 (23.6)	7 (3.3)	<0.001
Levofloksasin	12 (15.7)	3 (1.4)	0.29
Vankomisin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS*
Teikoplanin	0 (0.0)	0 (0.0)	NS*
TMP/SXT	6 (7.8)	1 (0.5)	<0.001
Mupirosin	0 (0.0)	1 (0.5)	0.55
Penisilin	49 (66.7)	159 (75.7)	0.06
Eritromisin	16 (21.0)	21 (10.0)	0.01
Klindamisin	10 (13.1)	19 (9.04)	0.31
Gentamisin	17 (22.5)	0 (0.0)	<0.001
Toplam	76 (100.0)	210 (100.0)	

*NS: p değeri 1'e yakın (0.93)

*TMP/SXT: trimetoprim/sülfametaksazol

yondan sonra hastalığın hızlı ilerlemesi nedeniyle tüm dünyada yüksek mortaliteye neden olduğu bilinmektedir⁽¹⁴⁾. MRSA izolatlarının, genellikle tedavi seçeneklerini sınırlandıran diğer antibiyotik sınıflarına (farklı mekanizmalar yoluyla) direnç geliştirdiği ve bunun tedavilerde zorluk oluşturduğu bilinmektedir⁽¹⁵⁾. Bu çalışmada hastane ve toplum kaynaklı MRSA ve MSSA oranları ve antimikrobiyal direncinin on beş yıllık bir zaman dilimindeki değişimini değerlendirmeye aldık. Hastanemizde farklı zamanlarda antibiyotik direnç verilerinin incelenmesi ile hem uygun antibiyotik seçimine, hem de kısıtlı antimikrobiyal raporlanmasının antibiyotik direnç gelişimini önlemeye katkısını değerlendirmeyi amaçladık.

Staphylococcus aureus'ta antimikrobiyal direnç oranlarının hastaneden hastaneye ve değişik coğrafi bölgelere göre değiştiği bilinmektedir. MRSA epidemiyolojisi son yıllarda önemli değişiklikler göstermiştir. Birçok araştırma sonucuna göre, son dönemde MRSA oranının azaldığı⁽¹²⁾ bildirilirken farklı sonuçlar bildirilen araştırmalar da vardır. Avustralya'nın doğu sahilinde, 1988-1994 yılları arasında MRSA oranının sabit kaldığı bildirilmiştir⁽¹⁶⁾. On iki çalışmanın dâhil edildiği bir sistematik derlemede, Nijerya'da MRSA sıklığının %18.3'ten (2009), %42.3'e (2013) yükseldiği belirtilmiştir⁽⁸⁾. Kanada'da 2007-2016 yılları arasındaki MRSA izolatlarını değerlendiren bir araştırmaya

göre, toplum kaynaklı MRSA sıklığının anlamlı ölçüde arttığı, hastane kaynaklı MRSA sıklığının anlamlı ölçüde azaldığı (%26.1'dan %16.9'a) bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Nikolaras ve ark.'nın⁽¹⁷⁾ araştırmasında, MRSA oranının anlamlı ölçüde azaldığı (2000-2015) belirtilmiştir. Başka bir çalışmada, 2005-2014 yılları arasında toplum kaynaklı MRSA'larda anlamlı ölçüde azalma olduğu, ancak hastane kaynaklı MRSA oranında anlamlı bir değişimin gözlenmediği bildirilmiştir⁽¹⁸⁾. Çetinkol ve ark.'nın⁽¹⁹⁾ araştırmasında MRSA sıklığının 2008 yılından 2012 yılına kadar %35.1'den %18.5'e anlamlı derecede azaldığı belirtilmiştir. Hacettepe Üniversitesi'nde çocuk hastaları kan kültürlerinde üretilen ve 2000-2011 yılları arasında değerlendirilen çalışmaya göre, MRSA sıklığının %46.7'den %0'a kadar azaldığı rapor edilmiştir⁽²⁰⁾. Avrupa Antimikrobiyal Direnç Süreveyans Sistemi (EARSS)'nin 2003 yılı Türkiye verilerinde MRSA oranı %43 olup, Ulusal Antimikrobiyal Direnç Süreveyans Sistemi (UAMDS) verilerine göre ise 2011'de %32, 2016'da %24 olarak bildirilmiştir ve bu sonuçlara bakılarak MRSA oranının azaldığı görülmektedir^(21,22). Bu çalışmada, toplum kaynaklı MRSA ve MSSA sıklığında anlamlı bir değişim gözlenmezken, hastane kaynaklı MRSA oranının anlamlı ölçüde azaldığı, MSSA oranının ise anlamlı derecede artış gösterdiği saptanmıştır. Bulduğumuz sonuç Türkiye için yayınlanan diğer verilerle uyumludur. MRSA oranındaki azalmada temas izolasyonu, el hijyen uyumu, MRSA enfeksiyonu geçiren hastaların erken dönemde tanımlanması ve tedavisi gibi kontrol önlemlerinin artırılması ve sağlık hizmeti kalitesinin zaman içerisinde daha da iyileşmesi ile birlikte hastanemiz de 2014 yılından itibaren uygulamaya başladığımız kısıtlı antimikrobiyal raporlama sisteminin olumlu katkı yaptığı kanısındayız. MRSA oranındaki azalma cesaret verici olsa da bu oranlar hala bazı ülkelerin güncel MRSA oranına göre yüksektir.

MRSA en önemli nozokomiyal patojenlerden biridir ve dünya çapında halk sağlığı için ciddi bir tehdittir. MRSA'nın neden olduğundan sonra birçok ciddi enfeksiyonun tedavisinde en önemli sorunlardan biri de MRSA'nın çoklu ilaç direnci özelliğidir⁽²³⁾.

Avustralya'da yapılan 1988-1994 yılları arasındaki antimikrobiyal direnci araştıran bir çalışmaya göre, MRSA suşlarında, esas olarak siprofloksasin ve rifampisine karşı dirençler ortaya çıktığı bildirilmiştir. MSSA'da ise tetrasiklin direnç seviyesinde düşüş olduğu denenenmiş olan diğer antibiyotiklerin anlamlı bir değişiklik göstermediği bildirilmiştir⁽¹⁶⁾. Fransa'da, 1993-2007 arasındaki vakaları inceleyen 38 hastanenin dâhil edildiği bir çalışmada, gentamisin, eritromisin, rifampisin direncinin anlamlı derecede arttığı, florokinolonlar ve fusidik asit direncinin değişmediği bildirilmiştir⁽²⁴⁾. Nikolaras ve ark.'nın⁽¹⁷⁾ çalışmasında, 2000-2015 yılları arasında MRSA izolatlarında vankomisin, teikoplanin, linezolid, daptomisin ve kinupristin/dalfopristine direnç gözlenmediği bildirilmiştir. Diğer yandan rifampisin, trimetoprim-sülfametoksazol, gentamisin, tetrasiklin ve fusidik aside karşı direnç oranlarında önemli düşüş görüldüğü bildirilmiştir⁽¹⁷⁾. Başka bir çalışmada toplum kaynaklı MRSA'larda klindamisin (2009-2014), trimetoprim-sülfametoksazol direncinin arttığı, hastane kaynaklı MRSA'larda klindamisin ve trimetoprim-sülfametoksazol direncinde anlamlı bir değişim görülmediği bildirilmiştir. Hastane kaynaklı MSSA ve toplum kaynaklı MSSA'ların klindamisin direncinde anlamlı bir değişim olmadığı (2009-2014), trimetoprim-sülfametoksazol direncinde ise anlamlı derecede artış görüldüğü bildirilmiştir⁽¹⁸⁾. Walter ve ark.'nın⁽²⁵⁾ 2010-2015 yılları arasındaki hastane kaynaklı MRSA izolatlarını değerlendirdikleri çalışmada, tobramisin, siprofloksasin, moksifloksasin, klindamisin ve eritromisin direncinin belirgin bir şekilde azaldığı, ancak tetrasiklin ve gentamisine karşı direncin arttığı bildirilmiştir. Buna ek olarak MRSA'nın linezolid, teikoplanin, tigesiklin ve vankomisine direnç göstermediği rapor edilmiştir⁽²⁴⁾. Nichol ve ark.'nın⁽¹⁰⁾ 2007-2016 yılları arasındaki MRSA antimikrobiyal direncini değerlendirdikleri çalışmada, klaritromisin, klindamisin, trimetoprim/sülfametoksazol ve florokinolonlara karşı direncin zamanla anlamlı ölçüde azaldığı bildirilmiştir ($p < 0.0001$).

Bu çalışmada, genel olarak diğer araştırmalara benzer şekilde MRSA ve MSSA'da vankomisin ve teikop-

lanin direnci gözlenmezken, TK- MRSA'nın siprofloksasin, levofloksasin, klindamisin, gentamisin direnci ve HK-MRSA'nın siprofloksasin, levofloksasin, eritromisin, klindamisin, gentamisin direncinde anlamlı azalma gözlemlendi.

Toplum kaynaklı MSSA'nın gentamisin direncinin anlamlı düzeyde düşüş gösterdiği ancak, penisilin direncinin anlamlı düzeyde yükseldiği bulundu. Hastane kaynaklı MSSA'nın, siprofloksasin, trimetoprim/sülfametoksazol, eritromisin, gentamisin direncinde anlamlı derecede düşüş, fusidik asitde ise anlamlı derecede yükselme gözlemlendi. Araştırmaların sonuçlarına genel olarak bakıldığında, MRSA'da antimikrobiyallere karşı direnç paterni yıllar içerisinde değişmektedir. Bulgularımız son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. MRSA'da vankomisine karşı hala direnç yoktur ve çeşitli antibiyotiklere karşı direnci de değişen oranlarda azalmaktadır.

Bu araştırmanın bir kısıtlılığı retrospektif olarak planlanmasıdır. İkinci bir kısıtlılık, tüm olguların tek bir kurumdan olması ve toplumu tam olarak yansıtmamasıdır. Diğer bir kısıtlılık 2004-2019 yılları arasındaki profil değerlendirilirken yalnızca 2004 ve 2019 verileri kullanılmıştır. Arada kalan 14 yıla (2005-2018) ait verilerle yapılacak bir araştırma zaman içerisindeki değişimin daha net ortaya koyulmasını sağlayabilirdi.

Sonuç olarak, MRSA oranının ve ilaç dirençlerinin zaman içerisinde azalsa da, enfeksiyon etkeni olarak saptanmaya devam ettiği görülmektedir. MRSA oranını daha da azaltmak adına kontrol önlemlerinin artırılması önem taşımaktadır. Tedavi sırasında ilaç direncinin artmasını engellemek amacıyla hastanemizde antibiyotik kullanım politikalarına uyumun oldukça başarılı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Eski patojenlerin yeni antimikrobiyal ajan sınıflarına direnç kazanma kabiliyetinin fazlalığı nedeniyle, antimikrobiyal duyarlılık paternleriyle ilgili ortaya çıkan direnç eğilimlerinin anlaşılması için verilerin sürekli olarak takip edilmesi son derece önemlidir.

Etik Kurul Onayı: İstanbul S.B.Ü. Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (2020.07.134).

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Bu çalışmada herhangi bir fon veya destekten yararlanılmamıştır.

Hasta Onamı:

Ethics Committee Approval: İstanbul S.B.Ü. It was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Kanuni Sultan Süleyman Training and Research Hospital (2020.07.134).

Conflict of Interest: There is no conflict of interest between the authors.

Funding: No funding or support was used in this study.

Informed Consent:

KAYNAKLAR

1. de Kraker ME, Davey GP, Grundmann H, on behalf of the study Grup. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. Plos Med. 2011;8(10): e1001104 <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001104>
2. Lee AS, de Lancastre H, Garau J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18033 <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
3. Chen CJ, Huang YC. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. Clin Microbiol Infect. 2014;20(7):605-23. <https://doi.org/10.1111 / 1469-0691.12705>
4. Rodríguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. Braz J Infect Dis. 2010;14(Suppl 2):S87-96. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702010000800004>
5. Sakoulas G, Moellering RC Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Clin Infect Dis. 2008;46(Suppl 5):S360-7. <https://doi.org/10.1086/533592>
6. Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. Clin Infect Dis. 2014;58(Suppl 1):S10-9. <https://doi.org/10.1093/cid/cit613>
7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial

- Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA:2012.
8. Abubakar U, Sulaiman SAS. Prevalence, trend and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Nigeria: a systematic review. *J Infect Public Health*. 2018;11(6):763-70. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.05.013>
 9. Kaplan SL, Edwards MS, Torchia MM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children: Epidemiology and clinical spectrum. *UpToDate* (14/05/2017). <https://www.uptodate.com/contents/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-infections-in-children-epidemiology-and-clinical-spectrum> (Erişim: Ağustos 2019).
 10. Nichol KA, Adam HJ, Golding GR, et al. Characterization of MRSA in Canada from 2007 to 2016. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(Suppl 4):iv55-63. <https://doi.org/10.1093/jarc/dkz288>
 11. Prevention, E.C.F.D. and Control, Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), Stockholm, November 2017:52-54.
 12. Hombach M, Bloemberg GV, Böttger EC. Effects of clinical breakpoint changes in CLSI guidelines 2010/2011 and EUCAST guidelines 2011 on antibiotic susceptibility test reporting of Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(3):622-32. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr524>
 13. Aşçıoğlu S. Hastane enfeksiyonları. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2007;64(Ek ER-1):ER1-3.
 14. Nithya V, Rathinam S, Siva Ganesa Karthikeyan R, Lalitha P. A ten year study of prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and genotypic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* causing ocular infections in a tertiary eye care hospital in South India. *Infect Genet Evol*. 2019;69:203-10. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.031>
 15. Rolain JM, Abat C, Brouqui P, Raoult D. Worldwide decrease in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: do we understand something? *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(6):515-7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.017>
 16. Walter J, Noll I, Feig M, et al. Decline in the proportion of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from non-invasive samples and in outpatient settings, and changes in the co-resistance profiles: an analysis of data collected within the Antimicrobial Resistance Surveillance Network, Germany 2010 to 2015. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):169. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2271-6>
 17. Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C, et al. Curbing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. *Arch Intern Med*. 2010 Mar 22;170(6):552-9. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.32>
 18. Turnidge JD, Nimmo GR, Francis G. Evolution of resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals. Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR). *Med J Aust*. 1996;164(2):68-71.
 19. Nikolaras, G.P. Claudia P. Vicetti Miguell D , Asuncion Mejiasl D Amy Leber , Pablo J. Sanchez, Changes in the rates and population structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from bloodstream infections: A single-centre experience (2000–2015). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2019. 17:117-122.
 20. Vicetti Miguel CP, Mejias A, Leber A, Sanchez PJ. A decade of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*: A single center experience. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212029>
 21. Çetinkol Y, Çakır FÖ, Enginyurt Ö. Kan kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisiline direncin yıllara göre değişimi. *ANKEM Derg*. 2013;27(1):38-42.
 22. Gülmez D, Gür D. Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde 2000-2011 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar: 12 yıllık değerlendirme. *J Pediatr Inf*. 2012;6(3):79-83.
 23. U.A.D.S., Yıllık Rapor, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Ankara,(2011). 2011:32.
 24. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2016 Yıllık Raporu. 2016.
 25. Saikia L, Nath R, Choudhury B, Sarkar M. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Assam. *Indian J Crit Care Med*. 2009;13(3):156-8. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.58542>

***Bacteroides fragilis* Grubu İzolatların Klindamisin, Tetrasiklin ve Tigesikline Duyarlılıkları ve Dirençten Sorumlu *tet* ve *ermF* Genlerini Barındırma Durumları**

Antimicrobial Susceptibility of Bacteroides fragilis Group Isolates to Clindamycin, Tetracycline and Tigecycline, and Their Possession of tet and ermF Genes, which are Responsible for Resistance

Bermal Tekeş*[©], Semra Eminoğlu*[©], Elvan Sayın**[©], Nurver Ülger Toprak*[©]

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

**Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

Atf/Cite as: Tekeş B, Eminoğlu S, Sayın E, Ülger Toprak N. *Bacteroides fragilis* grubu izolatların klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılıkları ve dirençten sorumlu *tet* ve *ermF* genlerini barındırma durumları. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):23-32.

Öz

Amaç: Bu çalışmada *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakterilerin klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline direnç durumlarını saptamak, direnç oluşumundan sorumlu direnç genlerinin dağılımını belirlemek amaçlanmıştır.

Yöntem: Hastanemizde Ocak 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 82 BFG izolatı MALDI-TOF MS ile tanımlanmış, antimikrobiallere duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'in önerdiği agarda dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Aynı izolatlarda, antibiyotik direnç genlerinden *tetM*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1*, *tet36* ve *ermF* varlığı PCR ile araştırılmıştır.

Bulgular: Batın içi absesi (n=36), dokudan biyopsi (n=16), kan (n=14) ve diğer steril vücut sıvıları (n=12) gibi çeşitli klinik örneklerden üretilen 82 BFG izolatı tür düzeyinde; *Bacteroides fragilis* (n=48), *Bacteroides thetaioaomicron* (n=17), *Bacteroides vulgatus* (n=5), *Bacteroides ovatus* (n=4), *Bacteroides caccae* (n=1), *Bacteroides uniformis* (n=1) ve *Parabacteroides distasonis* (n=6) olarak tanımlanmıştır. İzolatların %54,9'u klindamisine, %84,1'i tetrasikline, %4,9'u tigesikline dirençli bulunmuş, tür düzeyinde irdelendiğinde *B. fragilis* suşlarına göre diğer BFG türlerinde direnç daha fazla saptanmıştır. İzolatların yalnızca %7,3'ü bu üç antibiyotiğe birden duyarlılık sergilemiştir. Klindamisine dirençten sorumlu *ermF* geni, genel anlamda izolatların %57,3'ünde saptanmış, *B. thetaioaomicron* türünde %70,6 ile en yüksek oranda bulunmuştur. Diğer direnç genlerinden *tet* pozitiflikleri %18,8'den %66,7'ye değişen oranlarla türler arasında dağılım göstermiştir. Genel anlamda *tetQ* gen pozitifliği diğer *tet* genlerine göre daha fazla bulunmuştur. İzolatların yalnızca %6'sında direnç genlerine rastlanmamıştır.

Sonuç: BFG izolatlarımızın klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline direnç durumları ve bu antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli role sahip direnç genlerine ait veri sağlanmıştır. Elde ettiğimiz bilgiler, yapmayı hedeflediğimiz BFG türleri içinde veya başka bakteriler arası direnç aktarımı çalışmalarına bir başlangıç oluşturması bakımından önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Bacteroides*, klindamisin, tetrasiklin, tigesiklin, *tet* geni, *ermF* geni

ABSTRACT

Objective: We aimed to determine the resistance of *Bacteroides fragilis* group (BFG) bacteria to clindamycin, tetracycline and tigecycline and establish the distribution of related resistance genes.

Method: In total 82 BFG strains, isolated from different clinical samples between January 2017 and December 2018, were identified by MALDI-TOF MS. Their antimicrobial sensitivities to were determined using agar dilution methodology (CLSI; M11-A7). The *tetM*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1*, *tet36*, and *ermF* genes were investigated by PCR.

Results: Eighty-two strains of BFG bacteria, isolated from intra-abdominal abscess (n=36), tissue biopsy (n=16), blood (n=14) and other sterile body fluids (n=12), were identified as *Bacteroides fragilis* (n=48), *Bacteroides thetaioaomicron* (n=17), *Bacteroides vulgatus* (n=5), *Bacteroides ovatus* (n=4), *Bacteroides caccae* (n=1), *Bacteroides uniformis* (n=1) and *Parabacteroides distasonis* (n=6). The resistance rates to clindamycin, tetracycline and tigecycline were 54.9%, 84.1%, 4.9%, respectively. Non-B. *fragilis* isolates were more resistant than *B. fragilis* strains. In total, 57.3% of the isolates were *ermF* gene positive, while *B. thetaioaomicron* had the highest rate (70.6%). The *tet* gene positivity ranged from 18.8% to 66.7% among species. The *tetQ* gene positivity was higher than other *tet* genes. The 92.7% of the isolates were resistant to at least one antibiotic, while 94% had at least one resistance gene.

Conclusion: This study provided data on antimicrobial resistance of our BFG isolates to clindamycin, tetracycline and tigecycline and the related resistance genes. However, our information obtained could also be a starting point for further investigation of the antibiotic resistance mechanisms of *Bacteroides* species, as well as, resistance transfer among BFG isolates and other bacteria.

Keywords: *Bacteroides*, clindamycin, tetracyclin, tigecycline, *tet* gene, *ermF* gene

Alındığı tarih / Received:
15.09.2020 / 15.September.2020

Kabul tarihi / Accepted:
19.10.2020 / 19.October.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

B. Tekeş 0000-0002-2541-2496
S. Eminoğlu 0000-0003-4511-4709
E. Sayın 0000-0002-1320-1704
N. Ülger Toprak 0000-0002-9766-5978

✉ nulger@marmara.edu.tr

GİRİŞ

Anaerop bakteriler mikrobiyotamızın büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Normalde mikrobiyota içinde bir denge halinde bulunan, konak için son derece yararlı olan bu bakteriler vücudun daha iç kısımlarına yayılarak fırsatçı, ciddi, hatta ölümcül enfeksiyonlara yol açabilmektedirler⁽¹⁾. Kolon mikrobiyotasının önemli bir elemanı olan *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakteriler anaerop enfeksiyonlardan birinci sıklıkta izole edilen organizmalardır⁽²⁾.

Geçmiş yıllarda, aerop ve anaerop bakterilerin birlikte oluşturdukları enfeksiyonların tedavisinde tetrasiklin sıklıkla kullanılmış, klindamisin ve gentamisin kombinasyonu ise altın standart olarak kabul edilmiştir. Ancak, zaten gentamisine intrinsek dirençli olan BFG bakterileri, yıllar içinde tetrasiklin ve klindamisine artan oranda direnç geliştirmişler, bu durum antibiyotiklerin ampirik tedavide kullanımlarını sınırlandırmıştır^(3,4).

Tetrasiklin, piyasaya sürüldükleri 1960'lı yıllarda ucuz, oral kullanılabilirliği ve geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle çoğunlukla gram negatif patojenlerin yol açtığı anaerop enfeksiyonların ampirik tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılmıştır⁽³⁾. Bakteriyostatik etkilidir. Bakteri ribozomunun 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir⁽⁵⁾. Sık kullanılmaları sonucu tetrasiklinlere yüksek oranda direnç gelişmiştir. İn vitro çalışmalara göre, BFG grubu izolatların %65'inden fazlası bu antimikrobiyale dirençli bulunmuştur. BFG bakterilerinde tetrasikline direnç, antimikrobiyalın bağlandığı ribozomlarda, yani hedef bölgede değişiklik veya bakteri içine giren tetrasiklinin aktif transportla bakteri dışına atılmasıyla gerçekleşmektedir^(4,6). Tetrasikline dirençli organizmalarda çeşitli *tet* direnç genleri gösterilmiştir. Hedef bölgedeki değişimden *tetQ* geni sorumlu tutulmuştur. *tetQ* geni indüklenebilir ve transfer edilebilir özelliktedir. Tetrasiklin direnç genleri genellikle diğer direnç genleriyle beraber bulunmaktadır^(7,8).

Tetrasikline direnç gelişmesiyle yeni antimikrobi-

yal arayışlarına gidilmiş, yeni nesil tetrasiklinler ve glisilsiklinler geliştirilmiştir. Tigesiklin, 2005 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından lisanslanan minosiklinin bir yarı sentetik türevidir. Yapısal özellikleri nedeniyle tigesiklin, tetrasiklini inaktive eden direnç mekanizmalarından etkilenmez⁽⁹⁾. Komplike karın içi enfeksiyonlarının, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ve çok antibiyotiğe dirençli organizmalarla anaeroplara yaptığı miks enfeksiyonların tedavisinde tigesiklin başarılı sonuçlar vermektedir. Ancak geniş katımlı sürveyans çalışmalarında yüksek minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerine sahip BFG izolatları saptanmıştır^(10,11). Yüksek MİK değerine sahip izolatlarda *tetX* ve *tetX1* genlerinin sıklıkla görülmesinden dolayı, tetrasiklin direncine yol açabilen bu *tet* genlerinin tigesiklinde direnç geliştirme potansiyelinde olabileceği ileri sürülmüştür⁽⁸⁾.

Klindamisin bakteri ribozomunun 50S alt birimine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etkisini gösterir. Ribozomun 50S alt biriminin metilasyona uğramasıyla klindamisine direnç gelişmektedir. Bu hedef bölgenin metilasyonu diğer antibiyotiklere, makrolid/linkozamid streptogramin B'ye (MLS direnci) de direnç gelişmesine neden olur⁽⁵⁾. BFG bakterilerinde klindamisin direnciyle ilişkilendirilen *erm* genleri gösterilmiştir. Merkezlere ve BFG türlerine göre farklılık olmakla beraber %70'lere varan oranda direnç gösterilmiştir^(12,13).

BFG bakteriler diğer anaerop ve aerop bakterilere göre antibiyotiklere daha dirençli organizmalardır⁽⁶⁾. Bu bakterilerde direnç, kromozomlarda mutasyonların oluşması veya direnç genlerinin plazmid ve konjugatif transpozon gibi DNA elementlerinin horizontal aktarımıyla gerçekleşmektedir⁽⁵⁾. Konjugatif transpozonlar *erm* ve *tet* genlerinin aktarımında önemli bir paya sahiptirler. Bir transpozon çok çeşit ve sayıda direnç geni bulundurabilir ve diğer bakterilere aktarılabilir. Farklı direnç geni taşıyan transpozonlar, buldukları bakterilere çok ilaca dirençli olma özelliği kazandırır⁽⁷⁾. Çok antibiyotiğe dirençli *Bacteroides* türlerinin sürekli artış göstermesi gelecekte bu bak-

terilere bağı enfeksiyonların tedavisinde ciddi problemlerin yaşanabileceğini düşündürmektedir⁽¹⁴⁾. Bu nedenle BFG bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık durumlarının yakından takip edilmesi gereklidir⁽¹⁵⁾.

Bu çalışmada hastanemizde, klinik materyallerden izole edilmiş BFG bakterilerin klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılık profilini belirlemek ve bu antibiyotiklerle ilişkili direnç genlerinin varlığını saptamak hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma protokolu Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu (No. 17.12.2018-253) tarafından onaylanmıştır.

Çalışma İzolatlarının Belirlenmesi: Marmara Üniversitesi İstanbul Pendik Eğitim ve Araştırma Mikrobiyoloji Laboratuvarına kültür istemiyle gönderilen, çoğu batın içi apsesi (n=32) olmak üzere doku (n=14), kan (n=14) ve diğer vücut sıvıları gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilen 82 BFG bakterisi çalışmaya alınmış, tekrarlayan üremelerden birisi çalışmaya dahil edilmiştir. Tablo 2’de izolatların elde edildikleri klinik örnekler göre dağılımı verilmiştir. Tanımlanan izolatlar -80°C’de saklanmıştır. Duyarlılık testi yapılacağı zaman, donmuş bakterilerin koyun kanı, hemin ve K vitaminiyle zenginleştirilmiş Brucella agarda üç kez ardışık olarak anaerop ortamda (“Bactron-I, SHEL LAB Anaerobic Chamber”, ABD; %85 azot, %10 karbondioksit ve %5 hidrojenenden oluşan gaz karışımı) kültürleri yapılmıştır.

Bakteri İzolatlarının Tanımlanması: Gram negatif boyanma özelliği gösteren, identifikasyon amaçlı kullanılan kanamisin (1000 µg), kolistin (10 µg) ve vankomisin (5 µg) disklerine dirençli, safralı besiyerinde üreyebilen, katalaz aktivitesine sahip, hareketsiz zorunlu anaerop basiller BFG bakterisi olarak değerlendirilmiştir⁽¹⁶⁾. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS; VITEK® MS (bioMérieux, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin kültüründen birer koloni MALDI-TOF MS slaytına yayıldıktan

sonra üzerlerine 1 µl matris solüsyonu (2,5-dihidroksibenzoik asit ve α-siyano-4-hidroksisinnamik asit) damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra slaytlar cihaz içine yerleştirilerek lazer atışlarına maruz bırakılmıştır. Elde edilen kütle spektrumları sistemin V3.0 bilgi veritabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakteri tanımlanmıştır. Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlanma kontrolü için *Escherichia coli* ATCC 8739 kökeni kullanılmıştır.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi: Bakterilerin antimikrobiallere duyarlılıklarını saptamak için “Clinical & Laboratory Standards Institute” (CLSI) tarafından anaeroplara için önerilen agarda dilüsyon yöntemi kullanılmıştır⁽¹⁷⁾. Klindamisin, tetrasiklin, tigesiklin antimikrobialleri (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ABD) çalışılmıştır. Antimikrobiallerin yarı yarıya seri sulandırılmalarıyla hazırlanmış, hemin, K vitamini ve %5 koyun kanı bulunduran Brucella agar kullanılmıştır. İnokülasyon için taze kültürden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve 1/10 oranında dilüe edilmiştir. Elde edilen bakteri sulandırımından 10 µL, antimikrobiyal içeren Brucella agara ekilmiş, plaklar anaerop ortamda 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. İzolatların antimikrobiallere duyarlılık durumu CLSI klinik sınır değerlerine göre yorumlanmıştır⁽¹⁷⁾. CLSI (M11-A7) kılavuzunda sınır değerleri verilmeyen tigesiklin için ise Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından anaeroplara için önerilen sınır değerleri (duyarlı:<4 µg/ml, orta duyarlı: 8 µg/ml, dirençli: ≥16 µg/ml) temel alınmıştır⁽¹⁸⁾.

Kontrol olarak *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 izolatı kullanılmıştır.

Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Saptanması: Bakteri DNA izolasyonu, taze bakteri kültüründen 4-5 koloni alınarak, DNaz, RNaz bulundurmeyen su (300 µL) içinde süspansiyon edilmiş ardından 20 dakika 95°C’de ısıtılarak gerçekleştirilmiştir.

Özgül primerler kullanılarak *tetM*, *tetX*, *tetX1*, *tetQ*,

tet36 ve *ermF* genleri amplifiye edilmiştir. Çalışmada kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları Tablo 1'de verilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmaya alınan 82 BFG bakterisi MALDI-TOF MS ile çoğunluğu *Bacteroides fragilis* (n=48) izolatlarından olmak üzere *Bacteroides thetaiotaomicron* (n=17), *Bacteroides vulgatus* (n=5), *Bacteroides ovatus* (n=4), *Bacteroides uniformis* (n=1), *Bacteroides caccae* (n=1) ve *Parabacteroides distasonis* (n=6) şeklinde tür düzeyinde tanımlanmıştır. İzolatların tamamı üzerinden değerlendirildiğinde antimikrobiyallere duyarlılık oranları; klindamisin için %29.3, tetrasiklin için %13.4, tigesiklin için ise %86.6 bulunmuştur. Bu oranlar türlere göre farklılık göstermiş, *B. fragilis* izolat-

larının diğer BFG türlerine göre daha fazla duyarlılık oranına sahip olduğu saptanmıştır. *B. fragilis* izolatlarında klindamisine duyarlılık oranı %41.7 iken diğer türlerde %0 ile %27.3 oranında değişiklikler gözlenmiştir. Benzer durum diğer antimikrobiyal duyarlılık durumları içinde geçerli olmuştur; *B. fragilis* izolatlarında tetrasiklin ve tigesikline duyarlılık oranları sırasıyla %18.6 ve %97.9 iken diğer türler için aynı antimikrobiyallere duyarlılık oranları; tetrasikline %0 ile %11.8 ve tigesikline %64.7 ile %83.3 arasında değişiklik göstermiştir. BFG bakterilerindeki direnç genlerinin varlığı ve dağılımı araştırıldığında direnç oranlarına uyumlu bir şekilde gerek *tet* genlerinin gerekse *erm* geninin *B. fragilis* izolatlarında bulunma oranı diğer türlere göre (*P. distasonis* izolatlarındaki düşük *erm* gen pozitifliği hariç) daha düşük bulunmuştur.

Tablo 1. PCR analizi ile direnç genlerinin saptanması için kullanılan oligonükleotid primerleri ve reaksiyon koşulları.

Gen	Primer dizileri	PCR reaksiyon koşulları
<i>ermF</i>	Fw; 5'- TAGATATTGGGGCAGGCAAG-3' Rw; 5'- GGAAATTGCGGAACTGCAAA-3'	95°C 15 sn, 58°C 60 sn, 72°C 30 sn, 35 X
<i>tetM</i>	Fw; 5'- ATCCTTTCTGGGCTTCCATT-3' Rw; 5'- TCCGTCACATTCCAACATA-3'	95°C 15 sn, 59°C 30 sn, 72°C 30 sn, 35 X
<i>tetQ</i>	Fw; 5'- ATCGGTATCAATGAGTTGTT-3' Rw; 5'- GACTGATTCTGGAGGAAGTA-3'	95°C 15 sn, 50°C 30 sn, 72°C 30 sn, 35 X
<i>tetX</i>	Fw; 5'- TTAGCCTTACCAATGGGTGT-3' Rw; 5'- CAAATCTGCTGTTTCATTCG-3'	95°C 15 sn, 55°C 30 sn, 72°C 30 sn, 35 X
<i>tetX1</i>	Fw; 5'- TCAGGACAAGAAGCAATGAA-3' Rw; 5'- TATTCGGGGTTGTCAAAC-3'	95°C 15 sn, 50°C 30 sn, 72°C 30 sn, 35 X
<i>tet36</i>	Fw; 5'- TTTCTGGCAGAGGTAGAACG-3' Rw; 5'- TTAATTCCTGCCTTCAACG-3'	95°C 15 sn, 57°C 30 sn, 72°C 30 sn, 35 X

*NS: P değeri 1'e yakın (0.93)

*TMP/SXT: trimetoprim/sülfametaksazol

Tablo 2. İzolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı.

<i>Bacteroides fragilis</i> grubu bakteriler	Apse	BİA ^a	Kan	Doku	BOS ^b	Periton sıvısı	Plevra sıvısı	Toplam sayı (n)
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	23	7	11	1	3	1	48
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0	7	4	2	1	1	2	17
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1	1	1	1	0	0	1	5
<i>Bacteroides ovatus</i>	0	1	1	1	0	0	1	4
<i>Bacteroides caccae</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Bacteroides uniformis</i>	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	4	1	0	0	0	0	6
Toplam Sayı (n)	4	36	14	16	2	4	6	82

^aBİA: Batın içi apse, ^bBOS: Beyin omurilik sıvısı

Tablo 3. *Bacteroides fragilis* grubu izolatlarının klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılık profilleri ve direnç geni bulundurma durumu.

<i>Bacteroides fragilis</i> grubu bakteriler	MİK değerlerine göre antimikrobiyallere duyarlılık durumları (%)									Direnç genlerinin bulunma oranı (%)					
	Klindamisin			Tetrasiklin			Tigesiklin			<i>tetM</i>	<i>tetQ</i>	<i>tetX</i>	<i>tetX1</i>	<i>tet36</i>	<i>ermB</i>
	Duyarlı ≤2 µg/ml	Orta =4 µg/ml	Dirençli ≥8 µg/ml	Duyarlı ≤4 µg/ml	Orta =8 µg/ml	Dirençli ≥16 µg/ml	Duyarlı ≤4 µg/ml	Orta =8 µg/ml	Dirençli ≥16 µg/ml						
<i>Bacteroides fragilis</i> (n=48)	41.7	8.3	50.0	18.8	2.1	77.1	97.9	2.1	0	22.9	43.8	35.4	18.8	25.0	56.3
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (n=17)	5.9	35.3	58.8	11.8	0	88.2	64.7	23.5	11.8	35.3	58.8	52.9	29.4	23.5	70.6
Diğer <i>Bacteroides</i> türleri ^a (n=11)	27.3	27.3	45.5	0	0	100	72.7	9.1	18.2	54.5	63.6	36.4	36.4	27.3	54.5
<i>Parabacteroides distasonis</i> (n=6)	0	0	100	0	16.7	83.3	83.3	16.7	0	50.0	66.7	50.0	50.0	33.3	33.3
Toplam izolat (n=82)	29.3	15.9	54.9	13.4	2.4	84.1	86.6	8.5	4.9	31.7	51.2	40.2	25.6	25.6	57.3

^aDiğer *Bacteroides* türleri: *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides coccae*

Tablo 4. *Bacteroides fragilis* grubu izolatlarının tetrasiklin, tigesiklin ve klindamisine duyarlılık profiline göre direnç genlerinden *tet* ve *ermF* gen dağılımı.

Antimikrobiyaller	<i>Bacteroides fragilis</i> grubu		Direnç genlerinin bulunma durumu n (%)					
	n (%)	82 (100)	<i>tetM</i>	<i>tetQ</i>	<i>tetX</i>	<i>tetX1</i>	<i>tetX</i>	<i>ermF</i>
Klindamisin								
Duyarlı	24	(100)	6 (25)	9 (37.5)	9 (37.5)	4 (16.7)	5 (20.8)	11 (45.8)
Orta duyarlı	13	(100)	5 (38.5)	7 (53.8)	6 (46.2)	4 (30.8)	4 (30.8)	6 (46.2)
Dirençli	45	(100)	15 (33.3)	26 (57.8)	18 (40)	13 (28.9)	13 (28.9)	30 (66.7)
Tetrasiklin								
Duyarlı	11	(100)	3 (27.3)	3 (27.3)	1 (9.1)	2 (18.2)	1 (9.1)	4 (36)
Orta duyarlı	2	(100)	1 (50.0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50.0)
Dirençli	69	(100)	21 (29.4)	39 (54.4)	31 (44.1)	18 (25.0)	20 (26.5)	42 (60.9)
Tigesiklin								
Duyarlı	71	(100)	20 (28.2)	37 (52.1)	28 (39.4)	20 (28.2)	22 (29.6)	40 (56.3)
Orta duyarlı	7	(100)	3 (42.9)	4 (57.1)	4 (57.1)	2 (14.3)	0	6 (85.7)
Dirençli	4	(100)	3 (75.0)	1 (25.0)	1 (25.0)	0	0	1 (25.0)
Toplam direnç geni pozitifliği n (%)			26 (31.7)	42 (51.2)	33 (40.2)	21 (25.6)	21 (25.6)	47 (57.3)

^aDiğer *Bacteroides* türleri: *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides coccae*

Tablo 3'de BFG bakterilerinin antimikrobiyallere duyarlılık durumları ve direnç gen pozitiflik oranları verilmiştir. Tablo 4 ve Tablo 5'de ise BFG izolatlarının antimikrobiyallere duyarlılık profiline göre direnç geni bulundurma ve klinik örneklerdeki duyarlılık durumlarının dağılımı gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada 2017-2018 yıllarını kapsayan iki yıllık

zaman diliminde, Marmara Üniversitesi İstanbul Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda klinik örneklerden izole edilen BFG bakterilerinin klindamisin, tetrasiklin ve tigesiklin antimikrobiyallerine duyarlılıkları agarda dilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır⁽¹⁷⁾. Çalışmamızın sonucunda yedi farklı BFG türü tanımlanmış, bunların farklı antimikrobiyal duyarlılık profili sergilediği görülmüştür. İzolatların yalnızca %7.3'ü çalışılan antimikrobiyallerden hiçbirine direnç göstermemiş, diğer izolat-

Tablo 5. *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerinin izole edildikleri klinik örneklere göre klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılık durumları.

Klinik örnekler n (%)	MİK değerlerine göre antimikrobiyallere duyarlılık durumları Sayı (%)					
	Klindamisin		Tetrasiklin		Tigesiklin	
	Duyarlı ≤2 µg/ml	Duyarlı olmayanlar >2 µg/ml	Duyarlı ≤4 µg/ml	Duyarlı olmayanlar >8 µg/ml	Duyarlı ≤4 µg/ml	Duyarlı olmayanlar >8 µg/ml
Apse ve BAİ ^a 40 (100)	14 (35)	26 (65)	5 (12.5)	35 (87.5)	34 (85)	6 (15)
Dokudan biyopsi ^b 16 (100)	5 (31.2)	11 (68.8)	4 (25.0)	12 (75.0)	15 (93.7)	1 (6.3)
Kan 14 (100)	3 (21.4)	11 (78.6)	1 (7.1)	13 (92.9)	12 (85.7)	2 (14.3)
Diğer steril vücut sıvıları ^c 12 (100)	2 (16.7)	10 (83.3)	1 (8.3)	11 (91.7)	10 (83.3)	2 (16.7)
Toplam izolat 82 (100)	24 (29.3)	58 (70.7)	11 (13.4)	71 (86.6)	71 (86.6)	11 (13.4)

^aBAİ: Batın içi absesi,

^bDokudan biyopsi: Biyopsi örneklerinden ikisi kemik dokusundan alınmıştır,

^cDiğer steril vücut sıvıları: beyin omurilik, plevra ve periton sıvıları

lar en az bir antimikrobiyale dirençli bulunmuştur. Tür düzeyinde direnç profili irdelendiğinde, *B. fragilis* dışındaki izolatların *B. fragilis* izolatlarına göre daha fazla direnç oranına sahip oldukları gözlenmiştir. Aynı şekilde direnç genlerinin de yaygın şekilde bulunduğu, %6'sı dışındaki tüm izolatların en az bir direnç genine sahip olduğu saptanmıştır.

Literatür bilgilerine göre, klinik örneklerden BFG türlerinin izole edilme oranlarında merkezlere göre birtakım farklılıklar gözlenmekle birlikte *B. fragilis* izolatları çoğunluğu oluşturmaktadırlar^(19,20). Bizim çalışmamızda da %58.5 (n=48) oranıyla *B. fragilis* birinci sırada yer almış bunu %20.7 ile *B. thetaiotaomicron* izlemiştir.

Sonuçlarımızı yayımlanmış diğer direnç verileriyle karşılaştırmak istediğimizde değerlendirmede birtakım zorluklar önümüze çıkmıştır. Ülkemizde BFG bakterilerinin antimikrobiyallere duyarlılıklarını araştırılan çok az sayıda çalışma bulunmaktadır⁽²¹⁻²⁴⁾. Dünya verileri incelendiğinde ise, çalışmalarda farklı duyarlılık yöntemlerinin kullanıldığı ya da sonuçları yorum-

lamak için farklı kılavuzların (CLSI veya EUCAST) sınır değerlerinin alındığı gözlenmektedir⁽²⁵⁻²⁷⁾. Bu çalışmada anaerob bakterilerin duyarlılıklarını saptamak için CLSI tarafından önerilen standart yöntem, agar dilüsyon testi uygulanmış, kıyaslama yapabilmek adına daha önceki çalışmada kullandığımız ve CLSI'nın sınır değerleri kullanılmıştır^(17,21).

Anaerob enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan klindamisine zaman içinde artan oranda direnç gelişmiş, ampirik antibiyotik tedavisinde uygulanamaz hale gelmiştir⁽³⁻⁶⁾. Bu çalışmada direnç oranları türlere bağlı olarak %45.5 ile %100 arasında değişmektedir, *B. fragilis* izolatlarında %50.0, *B. thetaiotaomicron* izolatlarında ise %58.8 bulunmuştur. Verilerimizi, merkezimizde 1999-2002 yılları arasında klinik örneklerden ve insan bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *B. fragilis* ve *B. thetaiotaomicron* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarıyla karşılaştırdığımızda direnç durumunda belirgin bir artış gözlenmektedir⁽²¹⁾. İlgili çalışmada gerek klinik izolatlar gerekse bağırsak mikrobiyotasında izole edilen *B. fragilis* türlerinde klindamisine direnç oranı

aynı; %36 bulunmuştur. *B. thetaiotaomicron* izolatları için ise klinik izolatlarda direnç %33, bağırsak izolatlarında ise %43 oranlarında saptanmıştır. BFG bakterilerde klindamisine direnç artışındaki benzer durum dünya ülkeleri verilerine de yansımıştır; ABD'de 1981-1989 yıllarında %5 ile %6 iken, 2000-2007 yıllarında %31->%35 değerlerine ulaşmış, Avrupa'da 1988-1989 yıllarında %9 oranı 20 yıl sonra %32.4'e yükselmiş, Kanada'da 1982'de yaklaşık %9 olan direnç oranı ise 2010 yılında %34'e artış göstermiştir⁽²⁵⁻²⁷⁾. Tür bazında yapılan çalışmaları irdelediğimizde, Kuveyt'den bildirilen *B. fragilis* izolatlarına ait klindamisine direnç oranı 2002 yılında %43 iken 2007 yılında %60 bulunmuştur⁽²⁸⁾. En yüksek direnç oran artışı Kore'den; *B. thetaiotaomicron* izolatlarında 1997 yılında %67, 2004 yılında ise %91 olarak bildirilmiştir⁽²⁹⁾. Ülkemizdeki çalışmalar incelendiğinde üç farklı merkezden; Doğan ve ark.⁽²²⁾, %18, Demir ve ark.⁽²³⁾, %28.6 ve Kangaba ve ark.⁽²⁴⁾, %44 oranlarında klindamisine direnç bildirmişlerdir. Literatür verileri değerlendirildiğinde BFG bakterilerinde klindamisine direnç düzeyinin çalışmanın yapıldığı zaman dilimine, ülkelere, antimikrobiyal kullanım politikasına, organizmaların izole edildiği materyal cinsine ve çalışılan bakteri türüne göre farklılık gösterdiği, bununla beraber artan oranda direnç geliştiği gözlenmektedir.

Bir zamanlar anaerob enfeksiyonların tedavisinde birinci seçenek olarak kullanılan tetrasikline zaman içinde BFG izolatlarının üçte ikisinden fazlası direnç geliştirmiştir. Direnç gelişiminde akne tedavisinde tetrasiklinin düşük dozda ve uzun süre kullanılması önemli payı olmuştur. Tetrasikline karşı gelişen yüksek direnç nedeniyle, yalnızca duyarlılık testleri yapılabildiğinde daha az şiddetli enfeksiyonların tedavisinde kullanılması önerilmektedir⁽³⁾. Bu çalışmada türler arasında farklılık olmakla beraber %77 ile %100 arasında değişen tetrasikline direnç saptanmıştır. Direnç oranlarımız daha önceleri ülkemizde elde edilen direnç oranlarına (%43-61) göre daha yüksek bulunmuştur^(27,30).

Tigesiklin, komplike intraabdominal ve komplike deri

ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ampirik monoterapisinde endikedir⁽³⁾. Avrupa Tigesiklin Sürveyans Çalışmasında (T.E.S.T.), tigesiklinin *Bacteroides* türlerine metronidazol ve imipenem kadar etkili olduğu saptanmıştır⁽¹⁰⁾. Avrupa çapında planlanan 824 BFG izolatının ele alındığı bu antibiyotik duyarlılık sürveyans çalışmasında, türler arasında bazı farklılıklar (*B. fragilis* için %1.8, *B. vulgatus* için %4.8) olmakla beraber tigesikline ortalama direnç oranı %1.7 bulunmuştur. Zaman içinde Avrupa ülkelerinde %8, ABD'de %5.2, Kore'de %17'lere varan oranlarda direnç artışları bildirilmiştir^(11,31,32). Bu çalışmada izolatlarımızın %4.9'u tigesikline dirençli, orta dirençli olanları da alırsak duyarlı olmayanların oranı %13.4 (n=11) bulunmuştur. *Bacteroides fragilis* harici BFG izolatları *B. fragilis* izolatlarına göre daha fazla oranda direnç sergilemiştir; duyarlı olmayan izolatların altısı *B. thetaiotaomicron* türünden oluşmaktadır. Duyarlı olmayanların yarısından fazlasının batın içi enfeksiyonlarından izole edilmesi, bu enfeksiyonlara karşı monoterapi şeklinde kullanılma endikasyonu bulunan tigesiklin ile enfeksiyon tedavisinde başarısızlıkların yaşanabileceğini akla getirmekte ve ileride bizi bekleyen tehlikenin boyutlarını gözler önüne sermektedir.

Araştırdığımız direnç genlerinin varlığı ve dağılımı irdelendiğinde izolatlarımızın birer direnç gen havuzuna benzerlik gösterdiği, yalnızca %6'sının herhangi bir direnç geni taşımadığı gözlenmiştir. Türler arasında birtakım farklılıklar göstermekle beraber direnç genlerinin varlığı duyarlı olmayan izolatlarda daha yüksek oranda saptanmıştır. Ancak direnç genlerin varlığı ile antimikrobiyale direnç durumu arasında birebir bağlantı kurulamamıştır. Örneğin *tet* genine sahip olmayan 15 izolatın 11'i tetrasikline dirençli bulunmuştur, bu durum araştırdığımız direnç genlerinin dışında başka mekanizmalarının direnç gelişiminden sorumlu olabileceğini akla getirmektedir. Diğer yandan tetrasikline duyarlı olan 11 izolatın 9'unda en az bir çeşit *tet* geni saptanmıştır, bu *tet* genlerin eksprese olmadığını veya mutasyonla aktivitesini kaybettiği anlamına gelebilir.

Tigesikline duyarlı olmayan (MİK \geq 8 μ g/ml) 11 izola-

tın *tet* genlerinin dağılımı incelendiğinde, hiçbirinde *tet36* geni saptanmamış, izolatların birisi hariç diğerlerinde en az bir çeşit *tet* geni saptanmıştır. Bu genlerden *tetM* altı, *tetQ* beş, *tetX* dört ve *tetX1* bir BFG izolatında bulunmuştur. Bartha ve ark.⁽⁸⁾, yaptıkları bir çalışmada, tigesikline duyarlı olmayan 12 izolatın tamamında *tetQ* geni, %15'inde *tetX*, %75'inde ise *tetX1* geni tespit edilmiş, bu oranlar tigesikline duyarlı olan 15 izolat için ise sırasıyla %75,%13 ve %46 bulunmuştur. Araştırmacılar direnç oluşumunda *tet* genlerinin önemli rolü olabileceğini vurgulamışlardır. Çalışmamızda tigesikline duyarlı olmayan izolatların 7'sinde *ermF* geni de saptanmıştır.

Sonuçlarımıza göre *ermF* gen varlığı ve dağılımı irdelendiğinde, izolatlarımızın %57'sinin *erm* genine sahip olduğu, en yüksek oranın (%70.6) *B. thetaiotaomicron* izolatlarında bulunduğu saptanmıştır. Merkezimizden izolatların da yer aldığı Avrupa ülkelerini kapsayan bir çalışmada *ermF* gen pozitifliği ülkelere göre %12.5 ile %50 arasında değişiklik göstermiş, bize ait izolatların *ermF* pozitifliği ise %56.3 bulunmuştur⁽³³⁾. Türkiye'den yapılan bir çalışmada ise bizim sonuçlarımıza yakın değerlerde, %58 oranında pozitiflik saptanmıştır⁽²⁴⁾. Klindamisine duyarlılık durumuyla *erm* gen varlığının arasındaki bağlantı irdelendiğinde, klindamisine dirençli 15 izolatımızda *ermF* geni saptanamamıştır, bu durum diğer *erm* direnç genleriyle veya başka mekanizmalar ile gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Literatür bilgilerine göre BFG izolatlarında en yaygın *ermF* genin bulunduğu bildirilmiştir, bu bilgi göz önüne alınarak çalışmamızda *erm* direnç genlerinden *ermF* geninin varlığını araştırılmıştır. Diğer yandan *ermF* geni taşıdığı halde klindamisine duyarlı 11 izolat tespit edilmiştir. Bu sessiz genler indüklenebilir klindamisin direncini işaret ediyor olabilir. Klindamisin deri ve yumuşak doku anaerop enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan uygun bir seçenektir, ancak indüklenebilir MLSB direnci bu ilacın etkisini sınırlamaktadır⁽⁵⁾. Anaeroplar için indüklenebilir klindamisin direncini saptamak adına yapılan eritromisin ile indüksiyon testi henüz standart hale getirilmediği için, izolatlarımızın indüklenebilir dirence sahip olup olmadığını test edilmemiştir⁽¹²⁾.

Sonuçlarımızdan bir diğer çarpıcı veri, izolatlarımızın %48.8'inin *ermF* geni ile birlikte en az bir *tet* genini de taşıyor olmasıdır. Bu genlerin birlikte bulunması izolatlarımızda CTnDOT benzeri *Bacteroides* konjugatif transpozonun var olduğunu düşündürmektedir. CTnDOT taşıyan BFG izolatların varlığında, makrolid, klindamisin veya tetrasiklin kullanılması halinde dirençli izolatların seçilmesi baskın hale gelmeleri söz konusu olacaktır⁽³⁴⁾.

Konjugatif transpozonlar BFG türleri arasında direnç gen aktarımında önemli role sahiptirler. Transpozonlar bakteriler arasında geçiş yaparken aynı zamanda direnç plazmitlerini ve diğer mobilize edilebilir ve dirençte rol alan DNA elemanlarının aktarımını ve bunların kodladığı proteinlerin eksprese olmasını da tetiklemektedirler. Bunun sonucunda diğer antimikrobilyallere direnç gelişmesine yol açan genlerin bakteriler arasında yayılmasına da sebep olabilmektedirler⁽³⁴⁾. Nitekim, merkezimizde daha önce yapılan bir çalışmada, her ne kadar moleküler yönden mekanizması araştırılmamış olsa da, klindamisine dirençli *Bacteroides* izolatlarının tetrasiklinin yanısıra piperasilin ve sefoksitine de anlamlı derecede direnç göstermeleri yukarıdaki varsayıma göre açıklanabileceği kanısındayız⁽³⁰⁾.

Özetle, bu çalışmada BFG izolatlarımızın klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline direnç durumları ve bu antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli role sahip direnç genlerine ait veri sağlanmıştır. Gerek tetrasiklinin gerekse klindamisin ampirik tedavide kullanılmayacağı, ancak duyarlılık test sonuçlarına göre duyarlı BFG bakterilerinin oluşturduğu hafif enfeksiyonlarda bu antimikrobilyallerin seçilebileceği aşıkardır. Çalışmamızda bu antimikrobilyallerin tedavide kullanılabilirliğini belirlemekten çok izolatların taşıdıkları direnç genleri, direnç genlerinin izolatlar arasında yayılım potansiyelini görmek daha anlamlı olmuştur. Elde ettiğimiz bilgiler, yapmayı hedeflediğimiz BFG türleri içinde veya başka bakteriler arası direnç aktarımı çalışmalarına bir başlangıç oluşturması bakımından önemlidir.

Etik Kurul Onayı: Çalışma protokolu Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu (No. 17.12.2018-253) tarafından onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No. SAG-C-YLP-100719-0260).

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Marmara University Institute of Health Sciences Ethics Committee (No. 17.12.2018-253).

Conflict of Interest: There is no conflict of interest between the authors.

Funding: Marmara University Scientific Research Projects Unit (Project No. SAG-C-YLP-100719-0260).

KAYNAKLAR

1. Finegold SM. Anaerobic bacteria: general concepts. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious diseases. 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2000:2519-36.
2. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4):593-621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>
3. Brook I. Antimicrobial treatment of anaerobic infections. Expert Opin Pharmacother. 2011;12(11):1691-707. <https://doi.org/10.1517/14656566.2011.576672>
4. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe. 2015;31:4-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.004>
5. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. Clin Infect Dis. 2004;39(1):92-7. <https://doi.org/10.1086/421558>
6. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis. 2014;59(5):698-705. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu395>
7. Bacic M, Parker AC, Stagg J, et al. Genetic and structural analysis of the *Bacteroides* conjugative transposon CTn341. J Bacteriol. 2005;187(8):2858-69. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2858-2869.2005>
8. Bartha NA, SÓki J, Urbán E, Nagy E. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. Int J Antimicrob Agents. 2011;38(6):522-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.07.010>
9. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? J Antimicrob Chemother. 2005;56(4):611-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dki291>
10. Nagy E, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline and comparators against a European compilation of anaerobes collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST). Scand J Infect Dis. 2010;42(1):33-8. <https://doi.org/10.3109/00365540903244543>
11. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. Comparative in vitro susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(10):3507-13. <https://doi.org/10.1128/AAC.00499-06>
12. Johnsen BO, Handal N, Meisal R, Bjørnholt JV, Gaustad P, Leegaard TM. *erm* gene distribution among Norwegian *Bacteroides* isolates and evaluation of phenotypic tests to detect inducible clindamycin resistance in *Bacteroides* species. Anaerobe. 2017;47:226-32. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.004>
13. Eitel Z, SÓki J, Urbán E, Nagy E; ESCMID Study Group on Anaerobic Infection. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. Anaerobe. 2013;21:43-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.001>
14. Cooley L, Teng J. Anaerobic resistance: should we be worried? Curr Opin Infect Dis. 2019;32(6):523-30. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000595>
15. Nagy E, Schuetz A. Is there a need for the antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria? Anaerobe. 2015;31:2-3. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.11.002>
16. Jousimies-Sommer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed. Star Publishing Company, Belmont, California, ABD, 2002.
17. CLSI. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standards, M11-A7. 2007, 7th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, ABD.
18. Tygacil®, 2010 Federal Drug Administration, Product Information. Pfizer Inc. Collegeville, PA, ABD.
19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Çeviren: Us AD, Başustaoğlu A. Tıbbi Mikrobiyoloji. 7.baskı, Pelikan Yayıncılık Ltd. Şti.,

- Ankara; 2016:258-64.
20. Citron DM, Poxton IR, Baron EJ. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and Other Anaerobic Gram Negative Rods. In: Manual of Clinical Microbiology. 9th ed, Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Washington, ASM. 2007:911-32.
 21. Ulger Toprak N, Celik C, Cakici O, Soyletir G. Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* strains isolated from clinical specimens and human intestinal microbiota. *Anaerobe*. 2004;10(5):255-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.05.005>
 22. Doğan M, Baysal B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2010;44(2):211-9.
 23. Demir C, Keşli R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen gram-negatif anaerob basillerin tiplendirilmesi ve antibiyotik direnç profillerinin E-test yöntemi ile belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2018;52(1):72-9. <https://doi.org/10.5578/mb.66175>
 24. Kangaba AA, Sağlam FY, Tokman HB, Torun M, Torun MM. The prevalence of enterotoxin and antibiotic resistance genes in clinical and intestinal *Bacteroides fragilis* group isolates in Turkey. *Anaerobe*. 2015;35(Pt B):72-6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.07.008>
 25. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). *Clin Infect Dis*. 2010;50(Suppl 1):S26-33. <https://doi.org/10.1086/647940>
 26. Nagy E, Urbán E, Nord CE; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(3):371-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03256.x>
 27. Karlowsky JA, Walkty AJ, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, Zhanel GG. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1247-52. <https://doi.org/10.1128/aac.05823-11>
 28. Jamal W, Shahin M, Rotimi VO. Surveillance and trends of antimicrobial resistance among clinical isolates of anaerobes in Kuwait hospitals from 2002 to 2007. *Anaerobe*. 2010;16(1):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.04.004>
 29. Roh KH, Kim S, Kim CK, et al. Resistance trends of *Bacteroides fragilis* group over an 8-year period, 1997-2004, in Korea. *Korean J Lab Med*. 2009;29(4):293-8. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.4.293>
 30. Ülger Toprak N, Çakıcı Ö, Çelik C, Söyletir G. Klindamisine dirençli *Bacteroides fragilis* ve *Bacteroides thetaiotaomicron* kökenlerinin diğer antibiyotiklere çapraz direnci. *Flora Derg*. 2005;10(1):14-9.
 31. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. Trends in antimicrobial resistance among *Bacteroides* species and *Parabacteroides* species in the United States from 2010-2012 with comparison to 2008-2009. *Anaerobe*. 2017;43:21-6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.003>
 32. Lee Y, Park YJ, Kim MN, Uh Y, Kim MS, Lee K. Multicenter study of antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Korea in 2012. *Ann Lab Med*. 2015;35(5):479-86. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.5.479>
 33. Sóki J, Wybo I, Hajdú E, et al. A Europe-wide assessment of antibiotic resistance rates in *Bacteroides* and *Parabacteroides* isolates from intestinal microbiota of healthy subjects. *Anaerobe*. 2020;62:102182. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102182>
 34. Waters JL, Salyers AA. Regulation of CTnDOT conjugative transfer is a complex and highly coordinated series of events. *mBio*. 2013;4(6):e00569-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00569-13>

Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Hastanemizde Yayılımı: Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişkinin Araştırılması[§]

Spread of Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Our Hospital: Investigation of Molecular Typing and Clonal Relationship

Reyhan Yiş*[®], Ebru Demiray Gürbüz**[®], Ayşe Nur Sarı**[®], Zeynep Gülay**[®]

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir, Türkiye

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Yaş R, Demiray Gürbüz E, Sarı AN, Gülay Z. Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının hastanemizde yayılımı: Moleküler tiplendirme ve klonal ilişkinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):33-41.

Öz

Amaç: Özellikle son 10 yılda Enterobacterales üyeleri arasında karbapenem direnci artan sıklıkta rapor edilmeye başlanmıştır. Karbapenemaz üreten izolatların taranması ve saptanması, hem tedavinin doğru yönlendirilebilmesi hem de yayılımın önüne geçilebilmesi açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda hastanemiz Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden ardışık olarak soyutlanan karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının karbapenemaz tipleri ve moleküler epidemiyolojik ilişkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Temmuz-Eylül 2014 tarihleri arasında Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden soyutlanan toplam 32 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya alındı. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması klasik yöntemlere ek olarak BD Phoenix ID/AST otomatize sistemi ile yapıldı. İzolatların karbapenemaz tipleri (*bla*OXA-48, *bla*NDM, *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*VIM ve *bla*GES) PCR ile araştırıldı. İzolatlar arasındaki klonal ilişki PFGE ile değerlendirildi.

Bulgular: Onsekiz izolatın yoğun bakım ünitelerinden, dokuz izolatın servislerden ve beş izolatın polikliniklerden gönderilen örneklerden izole edildikleri görülmüştür. İzolatların tümünde *bla*OXA48 geni pozitif olarak saptanmış, diğer karbapenemaz genleri bulunmamıştır. Hastanemizde 32 farklı hastadan üretilen izolatların A-L olarak adlandırılan 12 farklı PFGE pulsotipine sahip olduğu belirlendi. Bunlar arasında en fazla görülenler B (n=18) ve bununla yakın ilişkili B1 paterni (n=2) idi. Geriye kalan izolatlar, birbirinden farklı olan 11 tipte temsil edildi. Salgından sorumlu B pulsotipine sahip ilk izolatın Genel Yoğun Bakım ünitesinden kaynaklanarak yayılım göstermiş olduğu görüldü.

Sonuç: Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının hastanede yayılımının gastrointestinal kolonizasyonu olan hastalardan, hastane personelleri aracılığıyla diğer hastalara izolatların transferi yoluyla gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle aktif surveillance programları ile kolonizasyonu saptanarak temas izolasyonu ve etkin enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması yoluyla hastanelerde izolatların yayılımı sınırlandırılabilir.

Anahtar kelimeler: Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, moleküler tiplendirme, Klonal ilişki

ABSTRACT

Objective: Carbapenem resistance has been reported with increasing frequency among members of Enterobacterales, especially in the last 10 years. Screening and detection of carbapenemase-producing isolates is important in terms of both directing the treatment and preventing its spread. In our study, it was aimed to determine the carbapenemase types and molecular epidemiological relationships of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates, which were isolated sequentially from the samples sent to microbiology laboratory of our hospital.

Method: A total of 32 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates of the samples sent to microbiology laboratory between July and September 2014, were included in the study. In addition to classical methods, identification of isolates at species level was made with BD Phoenix ID/AST automated system. Carbapenemase types (*bla*OXA-48, *bla*NDM, *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*VIM and *bla*GES) of the isolates were investigated by PCR. The clonal relationship between the isolates was assessed with PFGE.

Results: It was noted that 18 isolates were obtained from intensive care units, 9 from inpatient and 5 from outpatient departments. The *bla*OXA48 gene was found in all isolates while the other carbapenemase genes were not found. It was determined that strains were isolated from 32 patients in our hospital had 12 different PFGE pulsotypes, named as A-L. Among these, the most common ones were B (n=18) and closely related B1 pattern (n=2). The remaining isolates were represented by 11 different types. It was observed that the first isolate with B pulsotype was responsible for the spread of the outbreak from General Intensive Care Unit.

Conclusion: It has been thought that the spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates in the hospital was probably occurred through the transfer of isolates from patients with gastrointestinal colonization to other patients through hospital staff. Therefore, the spread of the isolates in hospitals can be limited by detecting colonization with active surveillance programs and by applying contact isolation and effective infection control measures.

Keywords: Carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, molecular typing, clonal relationship

Alındığı tarih / Received:
28.07.2020 / 28.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:
22.10.2020 / 22.October.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

R. Yiş 0000-0001-5774-0315
E. Demiray Gürbüz 0000-0003-2849-9029
A. N. Sarı 0000-0002-3927-9921
Z. Gülay 0000-0002-4135-9154

✉ reyhanyis@yahoo.com

[§]Bu çalışma, 33. Ankem Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Antibiyotik direncinin giderek artıyor olması, ancak buna karşın yeni antibiyotiklerin geliştirilmiyor olması dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavi seçeneklerini azaltmaktadır. 1980'li yılların başlarında Geniş spektrumlu sefalosporinlerin keşfinden çok kısa süre sonra Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae*'lar ortaya çıkmış, bu izolatlar karşı karbapenem grubu antibiyotiklerin yoğun kullanımı da karbapenem direnci ile sonuçlanmıştır⁽¹⁻⁴⁾. CDC tarafından 2013 yılında karbapenem dirençli *Enterobacterales*'in (KDE) halk sağlığı açısından acil tehdit oluşturan üç mikroorganizmadan biri olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾. Özellikle son 10 yılda *Enterobacterales* üyeleri arasında karbapenem direnci artan sıklıkta rapor edilmeye başlanmıştır⁽⁶⁾. Karbapenem direnci ile ilişkili en sık görülen mekkanizma, karbapenemaz olarak da bilinen enzimlerdir. Özellikle *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemler dahil olmak üzere tüm β -laktamları inaktive edebilen karbapenemazlar sıklıkla tespit edilmektedir⁽⁷⁾.

Karbapenemazlar; enzim aktivasyonu için divalan katyonlara bağımlı olup olmamalarına göre: metallo karbapenemazlar (çinko bağımlı, sınıf B) ve non-metallo karbapenemazlar (çinko bağımsız, sınıf A, C ve D) olarak ayrılmıştır⁽⁷⁾. *K. pneumoniae* karbapenemazı (KPC) gibi sınıf A karbapenemazlar dünya çapında *K. pneumoniae*'da tanımlanmıştır⁽⁸⁾. Hastaneden kazanılmış çoklu dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında Sınıf B ve D karbapenemazlar tespit edilmiş ancak Sınıf C karbapenemazlar nadiren saptanmıştır⁽⁶⁾. Oksasilinazlar (OXA) olarak adlandırılan 400'den fazla Sınıf D β -laktamazın sadece bazı varyantları karbapenemaz aktivitesine sahiptir. Bunlar arasında da sadece birkaç alt grup *K. pneumoniae*'da (OXA-23, OXA-48, OXA-51, OXA-58) bildirilmiştir. OXA-48 en yaygın Sınıf D karbapenemazdır⁽⁷⁾. OXA-48 ilk olarak 2001 yılında Türkiye'de tanımlanmış olup, OXA-48 üreten *K. pneumoniae*'nın ana rezervuarlarından birinin Türkiye olduğu düşünülmektedir⁽⁹⁾. Yayılmının ilk aşamasında ülkemizdeki OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatından elde edilen *pOXA48a* adlı plazmidin, tüm

ülkeye ve Akdeniz ülkelerine OXA48'i yaymış olması, global bir yayılımın başlangıç noktasını oluşturmuştur.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (KDKP)'nin neden olduğu Kan dolaşımı enfeksiyonlarında mortalitenin yüksek seyretmesinin yanında karbapenemaz genlerinin çoğunlukla hastane ortamından kazanılarak mobil genetik elemanlar ve plazmidler aracılığıyla, hastadan hastaya ve diğer bakterilere de aktarılabilmesi sorunun boyutunu daha da arttırmaktadır⁽¹⁰⁾. Karbapenemaz aktivitesi gösteren bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda izolatların saptanması tedavinin doğru yönlendirilmesi ve yayılımın önüne geçilmesi açısından önem taşımaktadır. Olası salgın durumlarında mikrobiyal klonal ilişkinin saptanması enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkinliğinin izlemine de izin verir. Bunun yanında bu veriler epidemiyolojik olarak da oldukça değerlidir. Çalışmamızda hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden ardışık olarak izole ettiğimiz karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenemaz enzim tiplerinin ve moleküler epidemiyolojik ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar: Temmuz- Eylül 2014 tarihleri arasında farklı hastalardan Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden üretilmiş olan toplam 32 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edildi. Her hastanın tek izolatu çalışmaya alındı. **İzolatların identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri:** Örnekler, %5 Koyun Kanlı (Salubris, Türkiye) ve "eosin methylene blue" (EMB) (Salubris, Türkiye) agara ekimleri yapılarak 18-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İzolatların identifikasyon ve antibiyotik duyarlılıkları testleri klasik yöntemlere ek olarak BD Phoenix ID/AST (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD) otomatize sistemi ile çalışılarak "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre değerlendirildi⁽¹¹⁾.

Gradyent test çalışması: BD Phoenix ID/ AST otomati-

ze sistemiyle karbapeneme azalmış duyarlı (I) veya dirençli (R) olarak saptanan suşlarda karbapenem direncinin doğrulanması CLSI önerileri doğrultusunda gradient test stripleri (Ertapenem, Meropenem Etest®, bioMérieux, Fransa) [İmipenem MIC Test Strip (MTS-Liofilchem®)] kullanılarak yapıldı⁽¹²⁾.

Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması: İzolatların karbapenemaz tipleri (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{GES}) PCR ile araştırıldı⁽¹²⁻¹⁷⁾. DNA eldesi için 24 saatlik koloniler deiyonize suda süspansiyon edildi ve 10 dk. 100°C'de kaynatıldı. Beş dk. 10.000 devirde santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, kalıp DNA olarak kullanıldı. PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla %2'lik agaroz jel kullanıldı. Jel 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH=8) içinde 45 dakika yürütüldü ve beklenen bant büyüklüğündeki bantlar değerlendirildi. PCR çalışmasında araştırılan her bir gen bölgesi için pozitif olduğu sekans ile doğrulanmış izolatlar pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol için saf su kullanıldı.

Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri

ve PCR reaksiyon şartları Tablo 1'de yer almaktadır.

PFGE: Klonal ilişkiyi incelemek amacıyla izolatların makrorestriksiyon analizi, "Pulse Net *Escherichia coli* PFGE Protokolü" ne göre *Xba* I restriksiyon enzimi kullanılarak yapıldı⁽¹⁸⁾. Restriksiyonu yapılan izolatlar CHEF-DR® III (Bio-Rad) cihazında belirtilen koşullarda yürütülerek ayrımlandı; Isı=14°C, yürütme zamanı=19 saat, ilk sinyal (Initial switch time)=5 sn, son sinyal (Final switch time)=20 sn. ve voltaj=6.0 Volt/cm ya da 200 V. Her izolata ait PFGE profili birbirleri ile karşılaştırılarak, Tenover kriterlerine göre yorumlandı ve harf olarak paternler atandı⁽¹⁹⁾.

Çalışma, İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.09.2018, Oturum No: 2019/03, Karar No: 04)

BULGULAR

Otuz iki izolatın, 18'inin yoğun bakım ünitelerinden, dokuz izolatın servislerden ve beş izolatın polikliniklerden gönderilen örneklerden izole edildikleri görülmüştür.

Tablo 1. Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri ve PCR reaksiyon şartları.

Primer	Ürün Büyüklüğü	Kaynak	Reaksiyon Şartları
OXA-48A:5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG 3' OXA-48B:5'-GAGCACTTCTTTGTGATGGC 3'	743 bp	14	
VIM-A:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' VIM-B:5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'	388 bp	15	
IMP-F: 5'- GTTTATGTTACATACATCGTT-3' IMP-R: 5'- CCAAACCACTACGTTATCT-3'	396 bp	13	} 30 döngü Ön denatürasyon: 94°C 5 dk Denatürasyon: 94°C 1 dk Birleşme: 54°C 1 dk Uzama: 72°C 1,5 dk Son uzatma: 72°C 10 dk
KPCF: 5'-GTATCGCCGCTAGTTCTGC-3' KPCR: 5'-GGTCGTGTTCCCTTTAGCC-3'	493 bp	16	
NDM-1-F:5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' NDM-1-R:5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'	726 bp	17	} 30 döngü Ön denatürasyon: 94°C 5 dk Denatürasyon: 94°C 1 dk Birleşme: 54°C 1 dk Uzama: 72°C 1,5 dk Son uzatma: 72°C 10 dk
GES-1A 5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3' GES-1B 5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'	864 bp	18	

Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması: 18 izolatın yoğun bakım ünitelerinden, dokuz izolatın servislerden ve beş izolatın polikliniklerden olduğu belirlenen çalışma izolatlarının tümünde 743 bp büyüklüğündeki *bla*OXA48 gen bölgesi pozitif olarak saptanmıştır. Çalışılan diğer karbapenemazlara ait gen bölgeleri (*bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{GES}) tüm izolatlar için negatiftir. Yapılan tüm PCR çalışmalarında pozitif kontrol izolatlarında istenen bant büyüklüğünde bantlar görülmüş olup, negatif kontrollerde bant görülmemiştir.

PFGE: Tek hasta tek izolat olacak şekilde çalışmaya dahil edilen 32 izolatın PFGE analizi sonucunda A-L olarak adlandırılan 12 farklı patern belirlendi. Patern sıralaması en başta izole edilen izolattan, en son tarihte izole edilen izolata göre yapıldı. En sık görülen patern B paterni olup (n=18), bu patern ile ilişkili olduğu belirlenen B1 paterni de iki izolatta görüldü. D paterni de iki izolatta tespit edildi. Geri kalan paternlerin her biri birbirinden farklı olup, birer izolatta görüldü (Tablo 2). PFGE analizi bulguları sonucunda çalışma izolatlarının %62.5'inin B ve ilişkili paterni ile temsil edilirken; %6.3'ünün D paterni ile temsil edildiğini ve geri kalanının her birinin farklı bir paternde olduğu belirlendi. İzolatlara ait 12 farklı paternin ve B ile yakın ilişkili paternin gösterildiği jel görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Hastanelerde; geniş spektrumlu antimikrobiyal ilaçların, invazif prosedürler ve cihazların sık kullanımı, yüksek komorbidite sıklığı olan hastalar ve uzun süreli hastanede kalış süreleri gibi faktörler nedeniyle yoğun bakım üniteleri (YBÜ) antibiyotiklere dirençli bakteri enfeksiyonlarının daha sık görüldüğü bölümlerdir⁽²⁰⁾. *Klebsiella pneumoniae*, özellikle YBÜ'nde sepsis, üriner sistem enfeksiyonu, Kateter ilişkili enfeksiyonlar, pnömoni ve cerrahi alan enfeksiyonları gibi komplike ve tedavisi zor enfeksiyonlardan sorumlu olup, hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık nedenidir⁽²¹⁾. Son yıllarda, *K. pneumoniae*'nin yarattığı tehdit, karbapenem dirençli suşların ortaya

çıkması ve dünya çapında yayılması ile belirgin bir şekilde artmıştır⁽²²⁻²⁴⁾. KDKP'nin neden olduğu enfeksiyonlar, az sayıda tedavi seçeneğine sahip olup, karbapenem duyarlı izolatların etken olduğu enfeksiyonlara göre oldukça yüksek mortalite oranları ile ilişkilidir^(3,25-27). *K. pneumoniae*'nin sağlık kurumlarında salgınlara neden olma eğilimleri, çoklu dirençli izolatların oluşturduğu mevcut problemleri daha da şiddetlendirmektedir⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Çoğu nozokomiyal patojende olduğu gibi, çoklu ilaç direnci hem hastanede yatan hastalarda, hem de hastane ortamında antibiyotik kullanımının yaygın olduğu yerlerde bu organizmalara doğal selektif avantaj sağlamaktadır⁽²⁸⁾. Özellikle *K. pneumoniae*'da hastalar ve hastane personelinde, nazofarinks ve gastrointestinal sistem başta olmak üzere mukozal yüzeylerde sessiz kolonize olma, yeteneği vardır. Özellikle gastrointestinal kolonizasyon oranları toplumdaki bireylere göre hastane ortamındaki bireylerde oldukça yüksektir⁽³¹⁾. Hastanede oldukça yoğun antibiyotik kullanımının olması da kolonizasyon oranlarını arttırmakta, sessiz kolonize bireyler, yayılımı kolaylaştırarak, kontrolü zor olan salgınlara rezervuar rolü oynamaktadırlar⁽³¹⁾. Bunun yanında, *K. pneumoniae*'nin hastane personelinin ellerinde birkaç saat boyunca canlı kalabiliyor olması dahastane kaynaklı yayılımı kolaylaştıran bir diğer faktördür⁽³²⁾.

Salgınlara etkin kontrolünde, transmisyonun nasıl gerçekleştiğinin ayrıntılı olarak araştırılması, kaynağın saptanması büyük önem taşımaktadır. Enfeksiyonların veya salgınlara araştırılmasında kümeleri ve salgınlara tanımlamak, kaynağı izlemek ve yayılma zincirini belirlemek ve popülasyon yapısını ve patojen evrimini incelemek için çok sayıda alt tipleme tekniği kullanılmıştır. Son yıllarda *K. pneumoniae* izolatları ile lokal ve global yayılımının anlaşılması amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yöntem olarak plazmid analizi, ribotiplendirme, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı tiplendirme yöntemleri ve PFGE kullanılmaktadır^(33,34). Bu teknikler arasında, "Multilocus Sequence Typing" (MLST) ve

PFGE, *K. pneumoniae* salgınlarını araştırmak için en sık kullanılan iki yöntemdir. PFGE, moleküler epidemiyolojik yöntemler içinde, ilk olarak tanımlandığı 1983 yılından sonra standart bir yöntem haline gelmiştir. Kromozomal DNA polimorfizmine dayalı, tüm genomu hedef alan genotiplendirme yöntemi olup, bant paternlerinin benzerlik yüzdesi veya bant sayısı ve büyüklüğündeki farklılıklara göre izolatlar arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde kullanılır. PFGE ile megabaz büyüklüğündeki kromozom DNA'sı, restriksiyon enzimleriyle kesilmekte, farklı yönlerden elektrik akımı uygulama özelliğindeki elektroforez cihazı ile jel üzerinde yürütüldükten sonra kesilmiş olan DNA parçaları görüntülenebilmektedir⁽¹⁹⁾. PFGE, salgın ve salgın olmayan izolatları belirleme ve ayırtma yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, PFGE'nin çalışması zahmetlidir ve bu yöntemin sonuçlanması birkaç gün sürer. MLST, yedi gen lokusunun seKanslanmasına dayalı güçlü bir yöntemdir ve büyük bir MLST veritabanı mevcuttur. Bununla birlikte, MLST'nin ayrımcı gücü, salgın ve salgın olmayan izolatları ayırtma gücü düşük olup, zaman alıcı ve emek yoğun bir süreçtir. PFGE birçok mikroorganizma için halen 'altın standart' genotiplendirme yöntemi olup, MLST yapılamadığı durumlarda veya daha kolay bir yöntem ihtiyacı duyulduğunda, salgın ve salgın olmayan izolatların karakterizasyonu için etkili ve uygun yöntem olarak kabul edilmektedir⁽³⁵⁾. Tüm dünyadan ve ülkemizden, KDKP ile ortaya çıkan pek çok salgın durumu bildirilmiştir. Oteo ve ark.⁽³⁶⁾ 2011 Ocak-2012 Mayıs tarihleri arasında, İspanya'da altı farklı bölgedeki 10 hastanede, *bla*_{OXA-48} üreten *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan, PFGE ile iki tanesi ana klon olmak üzere altı farklı klon saptanmış geniş bir salgın bildirmişlerdir. Almanya'da bir hastanede 2010 Haziran-2012 Temmuz tarihleri arasında Ducombe ve ark.⁽³⁷⁾ tarafından *bla*_{KPC-2} üreten *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan bir hastane salgını bildirilmiştir. Yunanistan'da Voulgari ve ark.⁽³⁸⁾ 2011 Aralık-2012 Mart tarihleri arasında *bla*_{OXA-48} geni taşıyan 13 KDKP izolatını incelemişler ve izolatların tamamının tek bir PFGE klonuna ait olduklarını saptamışlardır. Ülkemizde 2008 yılında bildirilmiş olan, *bla*_{OXA-48} üreten *K. pneumoniae* izolatlarının etken

olduğu ilk salgında 39 izolatın iki klona ait olduğu saptanmıştır⁽³⁹⁾. Çetinkol ve ark.⁽⁴⁰⁾, bir üniversite hastanesi yoğun bakımından izole ettikleri 20 adet OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* izolatı arasındaki klonal ilişkiyi inceledikleri çalışmada, PFGE ile özellikle salgın izolatı olarak değerlendirdikleri, bir klonda yoğunlaşan üç farklı pulsotip saptamışlardır.

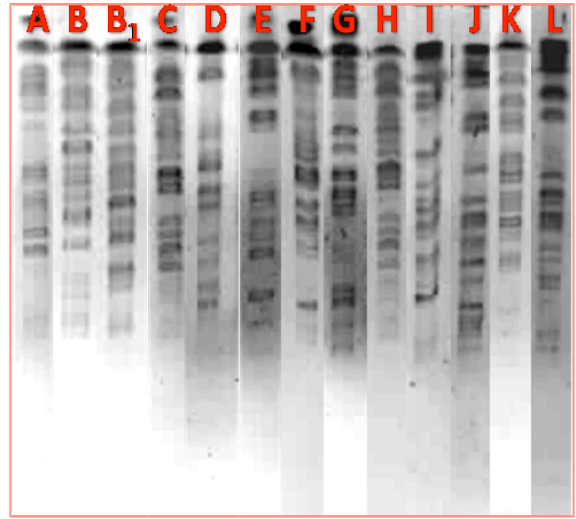
Çalışmamızda bir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde ardışık olarak izole edilen *bla*_{OXA-48} üreten, KDKP'nın hastane kaynaklı ilk salgını ve OXA-48 pozitif klonların hastane içi yayılımı dokümanite edilmiştir. *K. pneumoniae*'nin yüksek aktarılabileme eğilimi ve *bla*_{OXA-48} taşıyan plasmidin horizontal gen transfer kabiliyeti salgın oluşumuna yakınlık yaratan faktörlerdir⁽⁴¹⁾. Çalışmada izolatların daha çok kolonize oldukları YBÜ'lerinden gönderilen örneklerden üretilmiş olduğu (n=18) dikkat çekmektedir. En çok izolasyon, hastanemiz genel YBÜ'nden gönderilmiş olan örneklerde olmuştur (n=9). KDKP izole edilmiş en sık klinik örnek olan İdrar (n=17), yapısı gereği hasta personelinin elleri yoluyla kolaylıkla etkenin yayılımını sağlayabilecek bir örnektir. Bunun yanında kolonizasyonun en sık tespit edildiği rektal bölgeye yakınlık ve İdrar sondası için sürekli manipülasyon, izolasyon sıklığını açıklayabilir.

Çalışmamızda PFGE analiz sonuçlarına göre 32 farklı hastadan üretilen *K. pneumoniae* izolatlarının 12 pulsotip altında (A-L) kümelendiği saptanmıştır. Yirmi izolat bir küme oluşturmuş [Pulsotip B (n=18) ve bununla yakın ilişkili B1 paterni (n=2)] diğer 12 izolat herhangi bir kümeye dahil edilmemiştir. İzolatların kümelene oranı %62.5 (32 izolattan 12'si) olarak bulunmuştur. B+B1 pulsotipine sahip 20 izolatın 13 tanesi yoğun bakım hastalarından izole edilmiş olup, bu durum KDKP'nın YBÜ'lerindeki yüksek aktarılabileme eğiliminin göstergesi olarak kabul edilebilir. YBÜ kaynaklı izolatlar dışında B pulsotipine sahip izolatların dört tanesi genel cerrahi servisten, bir tanesi nöroloji servisten, iki tanesi de poliklinikten izole edilmiştir. Salgından sorumlu B pulsotipine sahip ilk izolatın genel yoğun bakım ünitesinden kaynaklanarak yayılım göstermiş olduğu görülmüştür. Genel

Tablo 2. Klinik örnekler ve servislere göre PFGE paternlerinin dağılımı.

İzolasyon No	Örnek tipi	Servis	PFGE paterni
1	İdrar	Üroloji Böbrek taşı plk	A
4	Trakeal Aspirat	Genel YB	B
5	Kateter	Genel YB	B
6	İdrar	Beyin Cerrahi YB	B
8	İdrar	Nöroloji YB	B
9	Trakeal Aspirat	Genel YB	B
10	Kan	Genel YB	B
11	Kateter	Genel Cerrahi Servisi	B
12	İdrar	Nöroloji YB	B
13	İdrar	Genel Cerrahi Servisi	B
14	Yara	Genel Cerrahi Servisi	B
17	Trakeal Aspirat	Genel YB	B
22	İdrar	Genel YB	B
25	İdrar	Dahiliye Plk	B
26	İdrar	Nöroloji Servisi	B
28	İdrar	Genel Cerrahi Servisi	B
29	İdrar	Nöroloji YB	B
30	İdrar	Enfeksiyon Hastalıkları Plk	B
32	Trakeal Aspirat	Reanimasyon	B
3	Yara	Genel YB	B1
7	Trakeal Aspirat	Reanimasyon	B1
2	İdrar	Nöroloji Servisi	C
19	Kan	Dahiliye YB	D
20	Kan	Dahiliye YB	D
24	Yara	Genel YB	E
15	Kan	Reanimasyon	F
23	İdrar	Lokal Üroloji plk	G
16	İdrar	Nöroloji Servisi	H
27	Yara	Genel YB	I
32	Yara	Genel Cerrahi 2. kısım	J
21	İdrar	Beyin Cerrahi Servisi	K
31	İdrar	Organ Nakli Plk	L

yoğun bakımdan kaynaklı dokuz izolattan yedisinde, nöroloji yoğun bakım kaynaklı üç izolatta ve genel cerrahi servisi kaynaklı dört izolattın tamamında B pulsotipi saptanmıştır (Tablo 2). Çalışmamızda yer alan izolatlardan saptandıkları klinik örnek tipleri incelendiğinde; B+ B1 pulsotipindeki izolatlardan 10 tanesinin İdrar, beş tanesinin Trakeal Aspirat, iki tanesinin Kateter, iki tanesinin yara ve bir tanesinin Kan kültür örneklerinden izole edilmiş olduğu görülmüştür. Çalışmada yer alan 17 İdrar kültürü örneğinin 10'unda aynı pulsotipin saptanması, İdrarın etkeni aktarabilme ve yayabilme potansiyelinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Örnek tipine göre değerlendirildiğinde tüm Trakeal Aspirat ve Kateter örneklerinde B pulsotipi gösterilmiştir (Tablo 2). B pulsotipi pozitif KDKP hastaların verileri incelendiğinde servisler arası hasta transferinin gerçekleşmemiş olduğu, aynı pulsotipin servisler arası yayılımının ortak personel kullanımı yoluyla aktarım şeklinde ortaya çıkmış olabile-



Şekil 1. İzolatlara ait PFGE paternlerinin gösterildiği jel görüntüsü.

ceği düşünülmüştür.

KDKP ile kolonizasyon veya enfeksiyon için risk faktörleri, antibiyotik tedavisine maruz kalma, uzamış hastaneye yatış, YBÜ'nde yatış, immünsüpresyon ve organ transplantasyonu gibi sağlık hizmetleriyle ilişkili olsa da nadiren daha önce herhangi bir sağlık hizmeti teması olmaksızın, endemik olmayan bölgelerde toplum-kökenli enfeksiyonlar olarak ortaya çıkabilir. Bunun yanında KDKP, sadece immünsüpresif veya kritik hastalığı olanları değil, aynı zamanda daha önce sağlıklı olan ve kötü enfeksiyon kontrolü uygulanan sağlık ortamlarında bulunmuş hastaları da kolonize ya da enfekte edebilmektedir⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾.

Çalışma sonuçlarına göre dikkat çeken bir nokta, beş izolattın polikliniklerden gönderilen İdrar kültürü örneklerinden izole edilmiş olmasıdır. Karbapenemaz üreten izolatlar genellikle hastane kökenli olsa da, nadiren toplum kökenli izolatlar da saptanmaktadır⁽⁴⁵⁾. Özellikle *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} üreten izolatlar nozokomial ve toplum kökenli olabilmektedir⁽⁴⁶⁾. Çalışmaya alınan izolatlardan izole edildiği hastaların geriye dönük kayıtları incelendiğinde, polikliniklerden örnekleri gönderilmiş olan beş hastadan üçünün daha önce çeşitli servislere yatışları olduğu (1. hasta: üç defa üroloji servisi yatış; 2. hasta: üç defa genel cerrahi organ nakli servisi yatış ve bir defa lokal cerrahi ame-

liyathanesi yatış; 3. hasta: bir defa lokal cerrahi ameliyathanesi yatış ve bir defa üroloji servisi yatış), iki hasta için ise herhangi bir hastaneye yatış veya başvuru öyküsünün bulunmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu özellikle OXA-48 pozitif *K. pneumoniae*'nin endemik olarak saptandığı ülkemizde, KDKP izolatlarının etken olduğu hastane kökenli enfeksiyonların yanı sıra toplum kökenli enfeksiyonların da karşımıza çıkabileceğini düşündürmektedir.

Nozokomiyal salgınların ortaya çıkması durumunda moleküler epidemiyolojik izlem, etken izolatların yayılımını önleyerek, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması konusunda yardımcı olabilir. KDKP izolatlarının hastanede yayılımının muhtemelen gastrointestinal kolonizasyonu olan hastalardan, hastane personelleri aracılığıyla diğer hastalara izolatların transferi yoluyla gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle aktif sürveyans programları ile kolonizasyonun saptanarak temas izolasyonu ve etkin enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması yoluyla hastanelerde KDKP izolatlarının yayılımı sınırlandırılabilir. Ayrıca hastanede akılcı antibiyotik kullanımı, invaziv araçların kısıtlı kullanımı ve el hijyeni gibi standart önlemlere de hizmet içi eğitimler yoluyla dikkat çekilmiştir. Bunun yanında uzun süreli kullanıma rağmen tedaviye yanıt vermeyen toplum kökenli enfeksiyonlarda da, karbapenem direnci akıldta tutulmalıdır.

Çalışmamızda yer alan izolat sayısının az olması, salgın sürecinde hasta izolatları dışında çevresel ve hastane personellerinin sürveyans örneklerinin çalışılmamış olması çalışmamızın kısıtlılığı olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, hastanemizde ilk defa karşılaşmış olduğumuz karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları ile çalıştığımız için verilerimiz hastanemiz için epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır. Bunun yanında çalışma 2014 yılındaki durumu göstermekte olup, aradan geçen uzun sürede hastanemizde KDKP izolatları ciddi oranda artmış ve farklı karbapenemaz tipleri saptanmaya başlanmıştır. Ancak hastanemiz adına sadece sporadik olarak KDKP izole ediliyor iken, yaşadığımız ilk salgın olması nedeniyle çıkardığımız çok sayıda ders olması açısından

dan çok büyük önem taşımaktadır. Salgın ve sonrasında öğrendiklerimiz, daha sonraki yıllarda benzer tablolara karşı vermiş olduğumuz refleks ve tepkileri belirlemiş olması açısından oldukça değerlidir.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.09.2018, Oturum No: 2019/03, Karar No: 04).

Çıkar Çatışması: Belirtilmemiştir.

Finansal Destek: Belirtilmemiştir.

Ethics Committee Approval: The study was carried out with the approval of the İzmir Bozyaka Training and Research Hospital Clinical Research Ethics Committee (Date: 05.09.2018, Session No: 2019/03, Decision No: 04).

Conflict of Interest: Not declared.

Funding: Not declared.

KAYNAKLAR

1. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: microbiology key points for clinical practice. *Int J Gen Med*. 2019;12:37-446. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S214305>
2. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 1):S28-36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
3. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):18. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0191-3>
4. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay A, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48 positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2950-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.01672-07>
5. Zowawi HM, Sartor AL, Balkhy HH, et al. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the countries of the Gulf cooperation council: Dominance of OXA-48 and NDM producers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3085-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.02050-13>

6. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-8.
<https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
7. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(6):609-16.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000608>
8. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015;277(5):501-12.
<https://doi.org/10.1111/joim.12342>
9. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
<https://doi.org/10.1128/aac.48.1.15-22.2004>
10. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. CLSI Document M100-S21, 2013. CLSI, Wayne, PA.
12. Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, et al. Identification of *bla*(IMP-22) in *Pseudomonas spp.* in urban waste water and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(5):901-8.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkp061>
13. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
14. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3129-35.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005>
15. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1660-4.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01172-08>
16. Samuelsen Ø, Thiilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):670-2.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq483>
17. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):622-32.
<https://doi.org/10.1128/aac.44.3.622-632.2000>
18. <https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
19. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
<https://doi.org/10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995>
20. Tran GM, Ho-Le TP, Ha DT, et al. Patterns of antimicrobial resistance in intensive care unit patients: A study in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2017;17:429.
<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2529-z>
21. Büyüktuna SA, Hasbek M, Çelik C, ve ark. Yoğun bakım ünitesinde gelişen *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonları: karbapenem direnci ve hasta mortalitesi ile ilgili risk faktörleri. *Mikrobiyol Bul.* 2020;54(3):378-91.
<https://doi.org/10.5578/mb.69679>
22. Zhang Y, Wang Q, Yin Y, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2):e01882-17.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01882-17>
23. Aires-de-Sousa M, Ortiz de la Rosa JM, Gonçalves ML, Pereira AL, Nordmann P, Poirel L. Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(9):1632-8.
<https://doi.org/10.3201/eid2509.190656>
24. Kohler PP, Volling C, Green K, Uleryk EM, Shah PS, McGeer A. Carbapenem resistance, initial antibiotic therapy, and mortality in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: A systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017;38(11):1319-28.
<https://doi.org/10.1017/ice.2017.197>
25. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1119-25.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq108>
26. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob. Agents.* 2011;37(5):415-9.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012>
27. Ben-David D, Kordevani R, Keller N, et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* blood stream infections. Clin Microbiol Infect. 2012;18(1):54-60.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03478.x>
 28. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: A systematic review. Am J Infect Control. 2016;44(11):1374-80.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.022>
 29. Guducuoglu H, Gursoy NC, Yakupogullari Y, et al. Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1- and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*: High mortality from pandrug resistance. Microb Drug Resist. 2018;24(7):966-72.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0173>
 30. Protonotariou E, Poulou A, Politi L, et al. Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. Int J Antimicrob Agents. 2018;52(3):331-7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.004>
 31. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
 32. Casewell M, Phillips I. Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. Br Med J. 1977;2(6098):1315-7.
<https://doi.org/10.1136/bmj.2.6098.1315>
 33. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(8):3365-70.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00126-09>
 34. Ece G, Tunc E, Otlu B, Aslan D, Ece C. Detection of *bla*OXA-48 and clonal relationship in carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates at a tertiary care center in Western Turkey. J Infect Public Health. 2018;11(5):640-2.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.003>
 35. Zhou H, Liu W, Qin T, Liu C, Ren H. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole genome sequence-based typing of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2017;8:371.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00371>
 36. Oteo J, Hernández JM, Espasa M, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. J Antimicrob Chemother. 2013;68(2):317-21.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks383>
 37. Ducombe T, Fauchoux S, Helgig U, et al. Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. J Hosp Infect. 2015;89(3):179-85.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.012>
 38. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. J Antimicrob Chemother 2013;68(1):84-8.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks356>
 39. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(8): 2950-4.
 40. Cetinkol Y, Yildirim AA, Telli M, Calgin MK. The investigation of oxacillinase/metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Infez Med. 2016;24(1):48-53.
 41. Haverkate MR, Dautzenberg MJ, Ossewaarde TJ, et al. Within-host and population transmission of *bla*OXA-48 in *K. pneumoniae* and *E. coli*. PLoS ONE 2015;10(10):e0140960.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140960>
 42. ECDC. Risk assessment on the spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between health care facilities, with special emphasis on cross border transfer. European Centre for Disease Prevention and Control. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/110913_Risk_assessment_resistant_CPE.pdf [Erişim tarihi: Kasım 2012]
 43. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. Infect Drug Resist. 2012;5:133-41.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S26613>
 44. Chia JH, Su LH, Lee MH, et al. Development of high-level carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* among patients with prolonged hospitalization and carbapenem exposure. Microb Drug Resist. 2010;16(4):317-25.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0048>
 45. Cantón R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evaluation and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):413-31.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>
 46. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae world wide. Clin Microbiol Infect. 2014;20(9):821-30.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>

Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Çocuklarda Solunum Sinsiyal Virüsünün Saptanması ve Moleküler Analizi

Identification and Molecular Analysis of Respiratory Syncytial Virus In Children With Lower Respiratory Tract Infections

İmran Sağlık*^①, Dilek Çolak**^②, Derya Mutlu**^②, Rabia Can Sarınoğlu***^③, Dilara İnan****^④
Nurgül Günay*****^⑤, Gözde Öngüt**^②, Nihal Oygür*****^⑥, Oğuz Dursun*****^⑦

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

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

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

****Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

*****Akdeniz Üniversitesi Hastanesi, Enfeksiyon Kontrol Komitesi, Antalya, Türkiye

*****Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Atf/Cite as: Sağlık İ, Çolak D, Mutlu D, Sarınoğlu RC, İnan D, Günay N, Öngüt G, Oygür N, Dursun O. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda solunum sinsiyal virüsünün saptanması ve moleküler analizi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):42-9.

Öz

Amaç: Bu çalışma, alt solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) nedeniyle hastanemizde tedavi gören çocuk hastalarda saptanan solunum sinsiyal virüsü (RSV) suşlarının genotipini belirlemek ve moleküler ilişkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Aralık 2012-Mayıs 2013 tarihlerinde, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde ASYE tanısı konulan 72 hastadan nazofarengeal sürüntü alınmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (RealStar RSV RT-PCR, Altona Diagnostics) yöntemiyle 28 RSV A ve 1 RSV B belirlenmiş, RSV A suşlarının 20'sinin RSV G geninin bir bölümüne dizi analizi yapılmıştır. Nükleotid dizileri ClustalX programı (sürüm 2.1) ile analiz edilmiştir. Filogenetik ağaç MEGA (sürüm 6.06) yazılımı kullanılarak "neighbor-joining" yöntemiyle oluşturulmuştur.

Bulgular: Hastaların ortanca yaşı 35 gün (8-6061) olarak belirlenmiştir. Dizi analizi yapılan 20 izolat RSV-A genotip GA2 olarak tiplendirilmiştir. On bir RSV-A izolatı birbiri ile identik bulunmuş, bunların altısının hastane kaynaklı, beşinin ise toplum kaynaklı RSV enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Identik olan ve nozokomiyal enfeksiyon düşünülen altı hastanın dördünün yenidoğan yoğun bakım ünitesinde (prematür), birinin yenidoğan kliniğinde, birinin ise pediatrik hematoloji-onkoloji kliniğinde olduğu saptanmıştır. Enfeksiyonun belirlenmesiyle standart izolasyon önlemleri gözden geçirilmiş ve virüsün yayılması önlenmiştir. Dizileme yapılan tüm hastalar bölgemizde yaşamaktaydı. Toplum kaynaklı enfeksiyonu olan hastalardan beşinin identik suşla, dokuz hastanın ise bunlardan filogenetik olarak farklı suşlarla enfekte olduğu görülmüştür.

Sonuç: Hastanemizde çocuklarda nozokomiyal ve toplum kaynaklı RSV A enfeksiyonlarına yol açan suşlar GA2 alt tipindedir. Bölgemizde toplum kaynaklı enfeksiyonlarda identik suşlar saptanmış ve bu suşlar nozokomiyal enfeksiyonlara da yol açmıştır. Nozokomiyal enfeksiyon açısından riskli kliniklerde RSV enfeksiyonlarının sıklığının takibi, moleküler mikrobiyolojik analizlerin yapılması ve standart izolasyon önlemlerinin uygulanması önemlidir.

Anahtar kelimeler: Solunum yolu enfeksiyonu, RSV, nozokomiyal, pediatri

ABSTRACT

Objective: This study was performed with the aim to define the genotypes of RSV strains in pediatric patients with lower respiratory tract infections (LRTIs), and to evaluate their molecular correlations.

Method: Nasopharyngeal swab samples were obtained from 72 patients with LRTI, between December 2012 and May 2013, in the Pediatrics Department of Akdeniz University Hospital. Twenty-eight RSV-A isolates and one RSV-B isolate were determined by real-time PCR (RealStar RSV RT-PCR, Altona Diagnostics). The part of the G gene was sequenced for genotyping 20 RSV-A strains. Nucleotide sequences were analyzed with ClustalX program (version 2.1). The phylogenetic tree was constructed with "neighbor-joining" by the using the MEGA (version 6.06) software.

Results: The median age of the patients were 35 days (range: 8-6061). All RSV-A isolates were identified as genotype GA2. Eleven isolates were identical; six of them caused hospital-acquired and five community-acquired RSV infections. Six patients were considered to have nosocomial infections including 4 cases in the Neonatal Intensive Care Unit (prematüre), one in the Neonatal Clinics and one in the Pediatric Hematology-Oncology Clinics. Five of eleven identical isolates were identified in patients with community-acquired infections.

Conclusion: Nosocomial and community-acquired RSV infections in our hospital were caused by RSV A GA2 subtype. Identical strains were detected in community-acquired infections in the same region, and; these strains also caused nosocomial infections. Monitoring of RSV infections, detecting of genotype with molecular microbiological analysis and applied standard isolation precautions are important in clinics at increased risk for nosocomial infections.

Keywords: Respiratory tract infection, RSV, nosocomial, pediatri

Alındığı tarih / Received:
23.05.2020 / 23.May.2020

Kabul tarihi / Accepted:
09.11.2020 / 09.November.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

İ. Sağlık 0000-0003-0864-4989
D. Çolak 0000-0002-8739-0130
D. Mutlu 0000-0002-6786-137X
R. Can Sarınoğlu 0000-0001-9222-8659
D. İnan 0000-0002-7551-6728
N. Günay 0000-0001-6868-2552
G. Öngüt 0000-0003-2808-1829
N. Oygür 0000-0001-8790-6136
O. Dursun 0000-0001-5482-3780

✉ imransaglik@gmail.com

GİRİŞ

Solunum sinsityal virüs (Respiratuar sinsityal virus; RSV) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de, çocuklarda görülen alt solunum yolu enfeksiyonlarının (ASYE) en önemli nedenidir. Kötü yaşam koşullarında ve küçük yaş gruplarında enfeksiyonun sıklığı artmaktadır. Yaşam koşullarının göreceli olarak kötü olduğu gelişmekte olan ülkelerde ASYE nedeniyle hastaneye yatırılan çocukların %27-96'sından RSV'nin sorumlu olduğu ve çoğunun altı aydan küçük olduğu bildirilmiştir. Tanıda kullanılan yöntemlerin duyarlılıklarına ve mevsimsel özelliklere göre de virüsün saptanma sıklığı değişebilmektedir⁽¹⁻³⁾. Daha önce merkezimizde yapılan bir çalışmada %26.5 RSV pozitifliği olduğu ve oranın erken yaşlarda daha da yükseldiği saptanmıştır⁽³⁾. Özellikle küçük çocuklarda ve immün düşkün hastalarda RSV enfeksiyonunun morbiditesi ve mortalitesi de artmaktadır⁽⁴⁻⁷⁾.

Tek sarmallı, negatif iplikli bir RNA virüsü olan RSV genomu yapısal olmayan protein (NS) 1 ve NS2, nükleokapsid protein (N), fosfoprotein (P), matriks proteini (M), küçük hidrofobik protein (SH), bağlanma glikoprotein (G), füzyon glikoprotein (F), transkripsiyon düzenleyici proteinler M2-1 ve M2-2 ve büyük bir polimeraz (L) içeren 11 proteini kodlayan 10 gen bölgesi içerir⁽⁸⁾. Yüzey glikoproteinleri olan G ve F nötralizan antikor yanıtını uyarırlar ve aşı çalışmalarının hedefidirler. G proteininin C terminal bölgesi moleküler analizler için sıklıkla kullanılmaktadır⁽⁹⁻¹¹⁾. Virüs, moleküler ve antijenik analizler sonucu G proteinindeki değişikliklere göre iki gruba (RSV A ve B); bunlarda alt gruplara (genotiplere) ayrılmıştır. RSV A ve B hem toplumda hem de hastane kliniklerinde dolaşarak enfeksiyonlara neden olmakla birlikte, mevsimsel olarak görülen epidemilerde genellikle biri hâkimiyet göstermektedir^(12,13).

Bir yaşına kadar çocukların % 50'sinde ilk RSV enfeksiyonu görülmekte ve virüs antijenik olarak farklı alt tipleriyle yaşam boyu yineleyen enfeksiyonlara yol açmaktadır⁽¹⁴⁾. RSV enfeksiyonları mevsimsel dağılım gösterdiğinden, kış aylarında sıklığı artmaktadır.

Enfeksiyonların önlenmesi için aşı ve antiviral ajanların çalışmaları devam etmekte ancak henüz etkinliği kesin kanıtlanmış bir yöntem bulunmamaktadır⁽¹⁰⁾. Toplumda bulunan RSV tiplerinin moleküler ve epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi, varsa yeni genotiplerin erken saptanarak salgınların kontrolüne ve aşı çalışmalarına katkıda bulunacaktır. Ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır⁽¹¹⁾.

RSV çocuk yaş grubunda nozokomiyal solunum yolu enfeksiyonlarının da başlıca nedenidir. Özellikle yenidoğan kliniklerinde ve immün düşkün hasta gruplarında RSV'ye bağlı nozokomiyal salgınlar bildirilmiştir⁽⁴⁻⁷⁾.

Bu çalışma, hastanemizin aynı bölümlerinde tedavi gören hastalarda eşzamanlı olarak RSV enfeksiyonu saptanması üzerine planlanmıştır. ASYE nedeniyle çocuk sağlığı ve hastalıkları bölümünde tedavi gören çocuk hastalardan saptanan RSV suşlarının tanımlanması, tiplendirilmesi ve moleküler ilişkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Aralık 2012 ve Mayıs 2013 tarihleri arasında, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları kliniklerinde ASYE nedeniyle tedavi gören 72 çocuktan (35 kadın, 37 erkek) nazofarengeal sürüntü örnekleri flocced eküvyon (Copan Diagnostics, Brescia, İtalya) ile alınarak, viral taşıma besiyeri (VTB) içeren tüp (Copan Diagnostics, Brescia, İtalya) içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Hastalara ait demografik bilgiler kaydedilmiştir. Gerçek-zamanlı PCR testi ile (RealStar RSV RT-PCR kit, Altona Diagnostics) RSV A ve B RNA araştırılmıştır. Saptanan nükleik asit miktarı dizileme için yeterli olabilecek 20 RSV A örneğine dizi analizi uygulanmıştır.

Dizileme ve Filogenetik Analiz: Yirmi RSV A geni için, RSV G bölgesi dizilenmiştir. Kısaca, total nükleik asit manyetik boncuk temelli otomatize bir sistemle ekstrakte edilmiş (EZ1 Virus Mini Kit v2.0; Qiagen, Germany); ters transkripsiyon reaksiyonu PrimeScript

RT Reagent (Takara, Japan) testi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. G proteininin C terminali F164 (5'-GTTATGACACTGGTATACCAACC-3') ve GA480 (5'-ACAAACCACCAAACCAACCC-3') PZR primerleri ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu 25 ml hacimle başlatılmış, Rotor-Gene (Corbett-Research, Avustralya) cihazı kullanılarak 95°C'de 12 dakika inkübasyonun ardından sırasıyla 94, 57 ve 72°C'de birer dakika süre ile 35 ısı döngüsü ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Amplikonlar agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuş ve Qi Aquick jel ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak jel ekstraksiyonu uygulanmıştır. Dizileme reaksiyonları her iki primer (F164 ve GA480) kullanılarak Sanger yöntemiyle Macrogen (Amsterdam, Hollanda) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen ve GenBank'dan ulaşılan nükleotid dizileri ClustalX programı (sürüm 2.1) ile analiz edilmiştir. Filogenetik ağaç MEGA (sürüm 6.06) yazılımı kullanılarak neighbor-joining yöntemi ile oluşturulmuştur.

BULGULAR

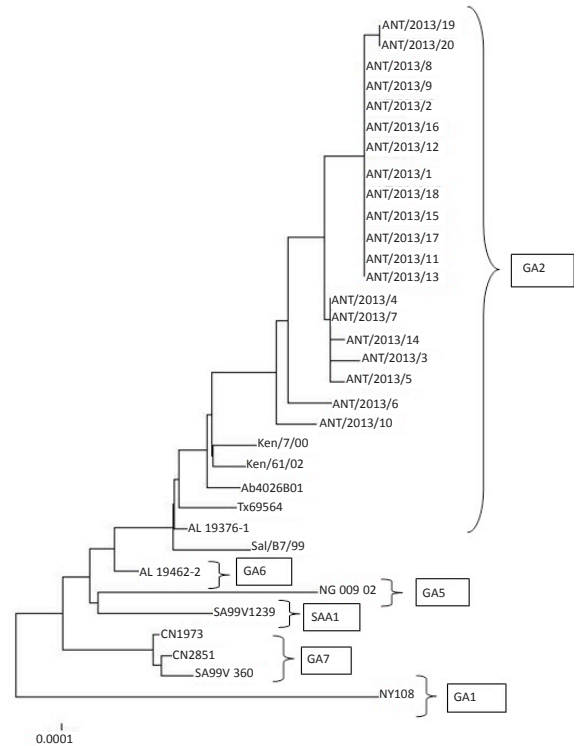
Çalışmaya alınan hastaların median yaşı 35 gün (aralık: 8 - 6061) olarak bulunmuştur. ASYE tanısı olan 72 çocuktan 29'unda (%40.3) RSV enfeksiyonu [(28 RSV A (%38.8) ve bir RSV B (%1.38)] saptanmıştır.

Pozitif bulunan 28 örnekte (%96.5) RSV A belirlenmiştir. Dizilenen 20 örneğin tümü RSV A genotip GA2 olarak saptanmıştır. Dizileme yapılan örneklerin alındığı 20 hastanın %42.1'inde (%21.1 prematür, %10.5 konjenital kalp hastalıklı, %10.5 maligniteli) komorbid hastalık/etken olduğu belirlenmiştir. Pozitif örnekler [Aralık (%15), Ocak (%25), Şubat (%35), Nisan (%10) ve Mayıs (%10)] bu aylara göre farklı oranlarda görülmüştür.

Genom dizilemesi sonrasında yapılan filogenetik analiz Şekil 1'de gösterilmiştir. On bir RSV A suşu (ANT/2013/1, ANT/2013/2, ANT/2013/8, ANT/2013/9, ANT/2013/11, ANT/2013/12, ANT/2013/13, ANT/2013/15, ANT/2013/16, ANT/2013/17 ve

ANT/2013/18) birbiri ile identik bulunmuştur (Tablo 1). Bunların beşinin toplum kaynaklı (ANT/2013/1, ANT/2013/2, ANT/2013/11, ANT/2013/12, ANT/2013/16) olduğu saptanmış olup; ikiz kardeşten alınan ve ilk saptanan (05 Ocak 2013) iki suşun (ANT/2013/1 ve ANT/2013/2) nozokomiyal bulaşların kaynağı olduğu düşünülmüştür.

İdentik olan onbir suştan altısının (ANT/2013/8, ANT/2013/9, ANT/2013/13, ANT/2013/15, ANT/2013/17 ve ANT/2013/18) nozokomiyal enfeksiyon etkeni olduğu görülmüştür. Bu altı hastada komorbid hastalık/etken olduğu saptanmıştır; dördünün prematür (yenidoğan yoğun bakım bölümünde), birinin konjenital kalp anomalisi (yenidoğan kliniğinde olup öncesinde yenidoğan yoğun bakım biriminde de yatmıştır), birinin ALL (kök hücre nakli sonrası pediatrik hematoloji onkoloji kliniğinde) tedavisi gören hastalar olduğu tespit edilmiştir. İlgili tarihlerde hastanemizde bu üç klinik aynı koridorda



Şekil 1. Dizilenen suşların filogenetik analizi. Değerlendirilen genom dizileri ANT/2013/1'den ANT/2013/20'ye kadar isimlendirilmiş, Genbank'tan elde edilen farklı genotipler de referans suşlarla birlikte filogenetik ağaçta gösterilmiştir.

Tablo 1. RSV saptanan ve moleküler analizi yapılan hastaların özellikleri.

No	Yaş (gün)	Klinik Tanı	Ek Klinik Tanı	Klinik
ANT/2013/1*	45	Bronkopnömoni ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/2*	45	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/3	32	Bronkopnömoni ^β	Yok	Yenidoğan Yoğun Bakım
ANT/2013/4	18	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/5	9	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/6	15	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/7	23	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/8*	35	Bronkopnömoni ^γ	Konjenital Kalp Hastalığı	Yenidoğan Kliniği/ qYenidoğan Yoğun Bakım
ANT/2013/9*	41	Bronkopnömoni ^γ	Prematür doğum	Yenidoğan Yoğun Bakım
ANT/2013/10	45	Bronkopnömoni ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/11*	31	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/12*	30	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/13*	22	Bronkopnömoni ^γ	Prematür doğum	Yenidoğan Yoğun Bakım
ANT/2013/14	34	Bronşiolit ^β	Yok	Yenidoğan Kliniği
ANT/2013/15*	18	Bronkopnömoni ^γ	Prematür doğum	Yenidoğan Yoğun Bakım
ANT/2013/16*	29	Bronkopnömoni ^β	Konjenital Kalp Hastalığı	Yenidoğan Yoğun Bakım
ANT/2013/17*	37	Bronkopnömoni ^γ	Prematür doğum	Yenidoğan Yoğun Bakım
ANT/2013/18*	4484	Bronkopnömoni ^γ	KHN (ALL)	Pediatric Hematoloji Onkoloji Kliniği /Yoğun Bakım
ANT/2013/19	1985	Bronkopnömoni ^β	KHN (Nöroblastom)	Pediatric Hematoloji Onkoloji Kliniği
ANT/2013/20	2015	Bronkopnömoni ^β	Nöroblastom (ex)	Pediatric Hematoloji Onkoloji Kliniği/Yoğun Bakım

* Filogenetik olarak identik suşlar, ilk iki suşun nozokomiyal bulaşların kaynağı oldukları düşünülmüştür.

^γNozokomiyal enfeksiyon gelişen hastalar koyu renkle yazılmıştır.

^βToplum kaynaklı enfeksiyon gelişen hastalar.

KHN: Kök Hücre Nakli

olup otomatik açılır kapı ile ayrılmaktadır. Pediatric hematoloji onkoloji kliniğinde tedavi gören iki hastadan ise toplum kaynaklı iki identik suş (ANT/2013/19 ve ANT/2013/20) saptanmıştır.

Toplum kaynaklı enfeksiyonu olan dokuz hastada filogenetik olarak (identik olan 11 suştan) farklı suşlar belirlenmiştir. Bu dokuz suştan ikisi identik olup (ANT/2013/4, ANT/2013/7) yenidoğan kliniğindeki iki hastada belirlenmiştir. Bu iki hastanın Antalya'nın aynı bölgesinde ikamet ettikleri öğrenilmiştir. Toplum kaynaklı olanlar içinde identik olan diğer ikisi ise (ANT/2013/19, ANT/2013/20) pediatric hematoloji onkoloji kliniğinde tedavi gören iki hastadan elde edilmiştir ve bunların nozokomiyal olan 11 suşa filogenetik olarak yakın olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA

RSV'nin genotip sayısı ve antijenik çeşitliliği fazladır ve dünyada çeşitli epidemiyolojik ve moleküler çalışmalar sonucu yeni suşlar bildirilmektedir. G ve F gen bölgelerindeki yüksek mutasyon oranı virüsün antijenik yapısının değişmesine ve farklı genotiplerin neden

olduğu yineleyen enfeksiyonlara neden olmaktadır. RSV-A 11 (ON1, GA1-GA7, SAA1, NA1 ve NA2) alt tipe ayrılmıştır⁽⁸⁾. RSV-A ON1 son yıllarda saptanmış ve toplumda daha hızlı yayıldığı bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Bir RSV mevsimi boyunca farklı genotiplerin birlikte dolaşabileceği ve baskın genotipin yıllara ve bölgelere göre değişebileceği bildirilmiştir^(10,14,15). Ülkemizde yapılan bir çalışmada aynı dönemde mevsimsel olarak RSV A'nın baskın olarak görüldüğü ve farklı genotiplerin saptandığı bildirilmiştir⁽¹¹⁾. Bizim çalışmamızda sadece bir hastada RSV B genotipi saptanmış olup, dizilenen toplum kaynaklı ve nozokomiyal enfeksiyon olan hastaların tümünden RSV A GA2 genotipi belirlenmiştir. Çalışmamızın tek merkezde oranla az sayıda örnekle yapılması ve çalışılan hasta grubu arasında bulaşların olmasının bu sonuca neden olabileceği düşünülmüştür. RSV GA2 alt tipi dünyada yaygın olup; Çin⁽¹⁴⁾, İran⁽¹⁵⁾, Güney Afrika⁽¹⁶⁾ ve Amerika^(13,17,18) gibi çeşitli ülkelerden bildirilmiştir. Çalışmamızda dizilenen suşlar gen bankasından elde edilen suşlarla karşılaştırıldığında Kenya (Ken/7/00) (Ken/61/02)⁽¹⁹⁾, Güney Afrika (Ab4026B01)⁽¹⁶⁾ ve Amerika'dan (TX69564)⁽¹³⁾ bildirilen suşlarla ilişkili bulunmuştur.

RSV enfeksiyonu normal toplumda sıklıkla üst solunum yolu enfeksiyonu olarak başlar ve genellikle ciddi tedavi gerektirmeden veya hafif destek/tıbbi tedavi ile iyileşebilir. Ancak immün sistemin tam gelişmediği yenidoğan/erken çocukluk döneminde veya immün yetmezlikli hastalarda (kök hücre nakli, solid organ nakli, hematolojik malignite vb.) enfeksiyon hızlı ve kolay bir şekilde alt solunum yollarını tutabilir ve ciddi tedavi gerektiren ağır klinik enfeksiyonlar ortaya çıkabilir. Üstelik bu hastalarda viral yük arttığından ve viral saçılma dönemi uzadığından bulaştırıcılık riski fazladır^(6,18,20-22). Çalışmamızda biri nozokomiyal biri de toplum kaynaklı RSV enfeksiyonu olan iki hastada (ALL, nöroblastom) ağır solunum yetmezliği tablosu gelişmiş, hastalardan biri ölmüştür. RSV-A suşlarıyla enfekte olan çocuklarda daha ağır klinik bulgular ortaya çıktığını belirten araştırmacılar olmakla birlikte; genotipler arasında klinik bir farklılık bildirmeyen çalışmalar da vardır^(10,11). Çalışmamızda tüm hastaların RSV-A suşu ile enfekte olduğu belirlenmiş, klinik bulgular açısından bir karşılaştırma yapılamamıştır.

RSV enfeksiyonlarının sıklığı mevsimsel dağılım göstermektedir⁽¹⁴⁾. Ilıman iklimlerde geç sonbahar, kış ve erken ilkbahar dönemlerinde enfeksiyon beklenmektedir⁽¹⁰⁾. Ülkemizdeki çalışmalarda RSV'nin sıklıkla Aralık ve Mart ayları arasında görüldüğü ve Ocak ayında pik yaptığı bildirilmiştir^(2,11). Çalışmamızda, örnekler Aralık-Mayıs ayları arasında alınmış; pozitif örneklerin daha önce hastanemizde yapılan benzer bir çalışmayla uyumlu olarak sıklıkla Ocak (%25) ve Şubat (%35) aylarında saptandığı görülmüştür. Enfeksiyonun sık görüldüğü ayların bilinmesi RSV salgınlarının erken belirlenmesi açısından yararlı olabilir. Bölgemizde RSV enfeksiyonları genellikle Nisan ayında sonlanmakta olup, Mayıs ayında nadir görülmektedir^(3,23). Çalışmamızda iki hastada (ANT/2013/19, ANT/2013/20) Mayıs ayında toplum kökenli RSV saptanmıştır. Bu hastalarda, immün yetmezlikleri nedeniyle (kök hücre nakli ve nöroblastom), enfeksiyona yatkınlığın olduğu ve viral saçılmanın uzadığı düşünülmüştür. RSV enfeksiyonlarında klinik bulgular, bağışıklık sorunu olmayan çocuklarda

ortalama 4-10 gün sürmektedir. Anak ve ark⁽²²⁾. onkoloji hastalarında kısa süre içinde tekrarlayan RSV enfeksiyonları bildirmiş, ancak etkeni tiplendirmedikleri için reenfeksiyon ya da uzamış enfeksiyon ayrımı yapmamışlardır.

Özellikle RSV enfeksiyonu açısından riskli hastaların tedavi gördüğü bölümlerde enfeksiyonunun diğer hastalara bulaşma olasılığı daima akılda tutulmalıdır. RSV damlacık yoluyla yani; öksürme, hapşırma veya konuşma sonrası havada asılı kalan virüs partiküllerini taşıyan damlacıkların solunmasıyla bulaşabilir. Ancak yakın temas gerektirdiğinden (<1.5 m) ve büyük partiküller havada uzun süre asılı kalamadığından, hastane enfeksiyonlarında damlacık yolu birinci derece sorumlu tutulmamaktadır. Virüs tezgâh, stetoskop, yatak gibi eşyaların yüzeyinde en az 6-12 saat enfeksiyöz kalabilmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonlarda genellikle sağlık çalışanları/hasta yakınları yoluyla deri temasıyla ve kontamine eşyalarla bulaş suçlanmaktadır^(4,24,25). RSV hastanede yatarak tedavi gören hastalarda yüksek oranda (pediatri kliniklerinde %20-40) bulaş oranına sahiptir ve immün düşkün hastalarda nozokomiyal salgınlara yol açabilir^(20,21,24,26). Nozokomiyal RSV enfeksiyonları genellikle yenidoğan kliniklerinde %30-70 oranında bildirilmekle birlikte farklı çalışmalarda %5.5-72 arasında oranlar da vardır^(4,5,25). Çalışmamızda nozokomiyal enfeksiyon saptanan altı hastanın tamamı komorbid hastalığa sahiptir. Thorburn ve ark.⁽⁴⁾ pediatri yoğun bakım ünitesinde görülen nozokomiyal RSV enfeksiyonlarında %73 oranında komorbid hastalık/etken olduğunu bildirmişlerdir. Kronik akciğer hastalığı, konjenital kalp hastalığı, nöromusküler hastalık, primer ve kazanılmış immün yetmezlikli hastalar ve prematür doğan infantlar gibi hasta gruplarının nozokomiyal RSV enfeksiyonu ve salgınları açısından da riskli gruplar olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu hastalarda RSV enfeksiyonlarının mortalitesinin arttığı da saptanmıştır^(4,6,10,26). Çalışmamızda nozokomiyal enfeksiyon saptanan hastaların çoğunluğu (4/6) prematür olup biri (1/6) ise konjenital kalp hastalığı olan bebeklerdir. Hematoloji onkoloji klinikleri de RSV salgınları açısından riskli alanlardır^(7,24,25). Çalışmamızda ALL

olup kök hücre nakli yapılmış bir hastada nozokomiyal RSV enfeksiyonu saptanması üzerine (ANT/2013/18) standart izolasyon önlemleri hızla alınarak virüsün daha fazla yayılması önlenmiştir.

Çalışmamızda nozokomiyal bulaştığı düşünülen altı identik suş bulunmuştur. İlk olarak toplum kaynaklı enfeksiyonu olan ikiz kardeşlerden 5 Ocak'ta saptanan iki suşla (ANT/2013/1, ANT/2013/2) konjenital kalp anomalisi nedeniyle (yenidoğan yoğun bakımda) tedavi gören hastadan saptanan ve nozokomiyal olarak edinilen suşun (ANT/2013/8) identik olduğu görülmüştür. Bu suşlar ile prematür doğum nedeniyle (Yenidoğan Yoğun Bakım'da) tedavi görmekte iken nozokomiyal enfeksiyon gelişen dört hastadan saptanan suşlar (ANT/2013/9, ANT/2013/13, ANT/2013/15, ANT/2013/17) da identik bulunmuştur. Bu dört hastadan ikisi (ANT/2013/9, ANT/2013/13) yenidoğan yoğun bakım ünitesinde Şubat ayında (14 gün ara ile) diğer ikisi (ANT/2013/15, ANT/2013/17) ise yine yenidoğan yoğun bakım ünitesinde Mart ayında (üç gün ara ile) saptanmıştır. Bunlarla identik olan ve nozokomiyal bulaşan altıncı suşun (ANT/2013/18), ALL nedeniyle kök hücre nakli yapılan ve pediatri hematoloji onkoloji kliniğinde tedavi gören hastaya ait olduğu görülmüştür. Örneklerin alındığı tarihte hastanemizde yenidoğan yoğun bakım ünitesi, yenidoğan kliniği ve hematoloji onkoloji kliniği aynı koridorda yer almakta olup otomatik kapı ile birbirinden ayrılmıştır. Bu durum klinikler arasında bulaş olasılığını ve bu hastanın immün düşkün olmasının bulaşı kolaylaştırmış olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, hastaların durumlarındaki değişmelere bağlı olarak klinikler arasında yer değiştirebilmeleri de etken suşların taşınmasına neden olabilmektedir. Hematoloji-onkoloji hastalarında nozokomiyal enfeksiyonlar raporlanmış olup ülkemizde de Beşışık ve ark. kök hücre nakli sonrasında nozokomiyal enfeksiyona bağlı olgular bildirmişlerdir^(24,27,28).

RSV enfeksiyonlarının önlenmesinde bir umut ışığı olan aşı için çalışmalar devam etmektedir. Bu

nedenle toplumda var olan genotiplerin saptanması gerek epidemiyolojik çalışmalar için gerekse aşı çalışmalarını için önem taşımaktadır. Ülkemizde RSV aşısının yararlılığı ile yapılan ilgili bir çalışmada çocukların ve/veya hamile kadınların aşılansız maliyet etkin bulunmuştur⁽²⁹⁾.

Çalışmamızda, hastanemizde ASYE nedeniyle tedavi edilen çocuk hastalarda saptanan RSV suşlarının GA2 alt tipinde kümelenildiği görülmüştür. Nozokomiyal enfeksiyon görülen tüm çocuklarda komorbid hastalıklar mevcuttur. Toplumda dolaşan RSV suşlarının nozokomiyal enfeksiyona ve/veya salgına neden olabileceği; komorbid hastalıkların bu riski arttırdığı düşünülmüştür. RSV enfeksiyonunun kontrolünde standart, damlacık ve temas yollarıyla bulaşı engelleyecek enfeksiyon kontrol önlemleri alınmalı; özellikle nozokomiyal enfeksiyonlar için riskli hasta gruplarında önemle uygulanmalıdır^(25,27,28). Toplumda dolaşan RSV genotiplerinin tespiti, enfeksiyonun kontrolü ve olası etkilerinin takibi açısından yarar sağlayacağı gibi yapılacak aşı çalışmalarında da yol gösterici olacaktır.

Etik Kurul Onayı: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (2020-10/29).

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Bu çalışmada herhangi bir fon veya destekten yararlanılmamıştır.

Hasta Onamı: Bu çalışmada hasta onamı gerekmektedir.

Ethics Committee Approval: It was approved by the Uludağ University Faculty of Medicine, Clinical Research Ethics Committee (2020-10/29).

Conflict of Interest: There is no conflict of interest between the authors.

Funding: No funding or support was used in this study.

Informed Consent: Patient consent is not required in this study.

KAYNAKLAR

1. Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM: Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 1998;3(4):268-80.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1998.00213.x>
2. Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, ve ark. Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum viruslarının prevalansı ev mevsimsel dağılımı, 2002-2014. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(2):188-200.
<https://doi.org/10.5578/mb.9024>
3. Sağlık İ, Mutlu D, Öngüt G, ve ark. Çocuklarda respiratuvar sinsityal virüs (RSV) enfeksiyonlarının tanısında hücre kültürü ve direkt floresan antikor testi yöntemlerinin karşılaştırılması. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2015;45(1):22-9.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2015.022>
4. Thorburn K, Kerr S, Taylor N, van Saene HK. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2004;57(3):194-201.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.03.013>
5. Dizdar EA, Aydemir C, Erdeve O, et al. Respiratory syncytial virus outbreak defined by rapid screening in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2010;75(4):292-4.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.01.013>
6. Visser A, Delpont S, Venter M. Molecular epidemiological analysis of a nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus associated pneumonia in a kangaroo mother care unit in South Africa. *J Med Virol.* 2008;80(4):724-32.
<https://doi.org/10.1002/jmv.21128>
7. Geis S, Prifert C, Weissbrich B, et al. Molecular characterization of a respiratory syncytial virus outbreak in a hematology unit in Heidelberg, Germany. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):155-62.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02151-12>
8. Zhu C, Fu S, Zhou X, Yu L. Complete genome sequence of human respiratory syncytial virus from Lanzhou, China. *Genome Announc.* 2017;24:5(34).
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00739-17>
9. Eroglu E, Singh A, Bawage S, et al. Immunogenicity of RSV F DNA vaccine in BALB/c mice. *Adv Virol.* 2016;2016:7971847.
<https://doi.org/10.1155/2016/7971847>
10. Vandini S, Biagi C, Lanari M. Respiratory syncytial virus: The influence of serotype and genotype variability on clinical course of infection. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1717.
<https://doi.org/10.3390/ijms18081717>
11. Bayrakdar F, Kocabas CN, Altas AB, et al. Genetic variability human respiratory syncytial virus subgroups A and B in Turkey during six successive epidemic seasons, 2009-2015. *J Med Virol.* 2018;90:456-63.
<https://doi.org/10.1002/jmv.24983>
12. Hause AM, Henke DM, Avadhanula V, Shaw CA, Tapia LI, Piedra PA. Sequence variability of the respiratory syncytial virus (RSV) fusion gene among contemporary and historical genotypes of RSV/A and RSV/B. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175792.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175792>
13. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis.* 2000;181(6):1891-6.
<https://doi.org/10.1086/315508>
14. Qin X, Zhang C, Zhao Y, Zhao X. Genetic variability of subgroup A and B respiratory syncytial virus strains circulating in southwestern China from 2009 to 2011. *Arch Virol.* 2013;158(7):1487-95.
<https://doi.org/10.1007/s00705-012-1552-z>
15. Faghihloo E, Salimi V, Rezaei F et al. Genetic diversity in the G protein gene of human respiratory syncytial virus among Iranian children with acute respiratory symptoms. *Iran J Pediatr.* 2011;21(1):58-64.
<https://doi.org/PMC3446103>
16. Madhi SA, Venter M, Alexandra R, et al. Respiratory syncytial virus associated illness in high-risk children and national characterisation of the circulating virus genotype in South Africa. *J Clin Virol.* 2003;27(2):180-9.
[https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00174-9](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00174-9)
17. Rodriguez-Fernandez R, Tapia LI, Yang CF, et al. Respiratory syncytial virus genotypes, host immune profiles and disease severity in young children hospitalized with bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2017;217(1):24-34.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix543>
18. Espinosa Y, San Martín C, Torres AA, et al. Genomic loads and genotypes of respiratory syncytial virus: Viral factors during lower respiratory tract infection in Chilean hospitalized infants. *Int J Mol Sci.* 2017;21:18(3).
<https://doi.org/10.3390/ijms18030654>
19. Scott PD, Ochola R, Ngama M, et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol.* 2004;74(2):344-54.
<https://doi.org/10.1002/jmv.20183>
20. Sağlık İ, Çolak D. Kök hücre aktarımı yapılan çocuklarda virüs nedenli solunum yolu enfeksiyonları. *J Pediatr Inf* 2017;11(1):29-34.
<https://doi.org/10.5578/ced.61869>
21. Choi JH, Choi EH, Jin Kang H, et al. Respiratory viral infections after hematopoietic stem cell transplantation in children. *J Korean Med Sci* 2013;28(1):36-41.

- <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.1.36>
22. Anak S, Atay D, Unuvar A, et al. Respiratory syncytial virus infection outbreak among pediatric patients with oncologic diseases and/or BMT. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45(3):307-11.
<https://doi.org/10.1002/ppul.21184>
23. Yalaz M, Kültürsay N. Respiratuar sinsisyal virus enfeksiyonu ve riskli bebeklerde palivizumab profilaksisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2014;57(3):200-13.
24. Kalayoğlu Beşışık S, Şen F, Midilli K, ve ark. Kemik iliği nakli ünitesinde yatan üç olguda nozokomiyal solunum sinsityal virus enfeksiyonu. *Mikrobiyol Bul.* 2008;42(2):359-64.
<https://doi.org/18697436>
25. Somer A. Nozokomiyal viral solunum yolu enfeksiyonları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi.* 2006;10:63-8.
26. Mlinaric-Galinovic G, Varda-Brkic D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37(4):237-46.
[https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(00\)00154-1](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(00)00154-1)
27. Jensen TO, Stelzer-Braid S, Willenborg C, et al. Outbreak of respiratory syncytial virus (RSV) infection in immunocompromised adults on a hematology ward. *J Med Virol.* 2016;88(10):1827-31.
<https://doi.org/10.1002/jmv.24521>
28. Shachor-Meyouhas Y, Zaidman I, Kra-Oz Z, Arad-Cohen N, Kaais I. Detection, control, and management of a respiratory syncytial virus outbreak in a pediatric hematology-oncology department. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013;35(2):124-8.
<https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3182756edc>
29. Pouwels KB, Bozdemir SE, Yegenoglu S, et al. Potential cost-effectiveness of RSV vaccination of infants and pregnant women in Turkey: An illustration based on Bursa data. *PLoS One.* 2016;30:11(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163567>

Kan ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan *Candida albicans* Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması[§]

Investigation of Phospholipase Activity in *Candida albicans* Strains Isolated From Blood and Oral Cavity Specimens

Buşe Tunç[®], Ebru Demiray Gürbüz[®], Mine Doluca Dereli[®]

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Tunç B, Demiray Gürbüz E, Doluca Dereli M. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):50-60.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında, konak hücre membranlarındaki fosfolipitleri parçalayan fosfolipaz B1, B2, C1 ve D1 aktivitesinin incelenmesi ve grup farklılıklarının araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Suşların fosfolipaz aktivitesi, plak yöntemi ve ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) ile araştırıldı.

Bulgular: Plak yöntemi ile kan ve oral kavite suşlarının sırasıyla 26 (%86.7) ve 24'ünde (%80.0) fosfolipaz aktivitesi belirlendi. Grupların fosfolipaz olumluluk oranları karşılaştırıldığında, anlamlı bir fark gözlenmedi ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$) ancak Pz ortalamaları (0.6138 ± 0.9823 , 0.6988 ± 0.9910) arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0.007$). RT-PZT ile kan ve oral izolatların tümünde (%100) PLB1, sırasıyla 29 (%96.7) ve 30 (%100.0)'unda PLB2, 27 (%90.0)'si ve 22 (%73.3)'sinde PLC1, 27 (%90.0) ve 21 (%70.0)'inde ise PLD1 ekspresyonu belirlendi. PLB1 ekspresyonu açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmazken ($t=-0.307$; $p=0.760$), PLB2 ekspresyonu kan izolatlarında anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.043$). PLC1 ekspresyon düzeyi oral suşlarda anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) saptanırken, PLD1 ekspresyonu açısından iki grup arasında istatistiksel fark izlenmedi ($p=0.732$). PLB1, PLB2, PLC1 ve PLD1 ekspresyonunun fenotipik yöntemle sırasıyla %100, %81.7, %71.6 ve %76.7 oranlarında; tüm genlerin ekspresyonu dikkate alındığında da %83.3 uyumlu olduğu görüldü. Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı (sırasıyla $p=0.602$; $p=0.555$; $p=0.241$; $p=0.096$).

Sonuç: Çalışmamıza alınan *C. albicans* izolatlarında yüksek oranlarda fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi, bu enzimlerin üretiminin virulans açısından önemli bir rol oynadığını desteklemekte olup, bulgularımız doğrultusunda PLB2 ve PLC1 enzimlerinin sırasıyla invaziv ve oral enfeksiyonlarda daha etkin olduğu söylenebilir, ancak bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim söz konusudur.

Anahtar kelimeler: *Candida albicans*, fosfolipaz, RT-PZT

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to investigate and compare the phospholipase B1, B2, C1 and D1 activities in *C. albicans* strains isolated from blood cultures and oral cavity specimens.

Method: Phospholipase activity of the strains was examined by plate method and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PZT).

Results: Twenty-six (86.7%) strains isolated from blood and 24 (80.0%) from oral cavities revealed phospholipase activity by plate method. No statistically significant difference ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$) was observed between the groups. However statistical difference was determined between the mean Pz values (0.6138 ± 0.9823 ; 0.6988 ± 0.9910) ($p=0.007$). PLB1 expression was detected in all (100%), PLB2 in 29 (96.7%) and 30 (100.0%), PLC1 in 27 (90%) and 22 (73.3%), PLD1 in 27 (90.0%) and 21 (70.0%) of blood and oral strains, respectively. While no significant difference was detected between PLB1 expression values of the groups ($t=-0.307$; $p=0.760$), PLB2 and PLC1 expressions were found to be significantly higher in blood ($p=0.043$) and oral cavity isolates ($p<0.001$), respectively. No difference was observed between PLD1 expressions ($p=0.732$). PLB1, PLB2, PLC1 and PLD1 expressions were 100%, 81.7%, 71.6% and 76.7% in agreement with the plate method. The agreement was 83.3% when all the phospholipase genes were considered. No correlation was detected between the Pz values and phospholipase expressions ($p=0.602$; $p=0.555$; $p=0.241$; $p=0.096$, respectively).

Conclusion: The high rates of phospholipase activity of the *C. albicans* isolates in our study, support the important roles of these enzymes in virulence. Our results may indicate that phospholipase enzymes encoded by PLB2 and PLC1 genes play more important roles for invasive and oral cavity infections, respectively; however large scale studies are needed on this issue.

Keywords: *Candida albicans*, phospholipase, RT-PCR

Alındığı tarih / Received:
23.05.2020 / 23.May.2020

Kabul tarihi / Accepted:
09.11.2020 / 09.November.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

B. Tunç 0000-0003-4134-4814
E. Demiray Gürbüz 0000-0003-2849-9029
M. Doluca Dereli 0000-0003-1656-8381

✉ ebru.demiray@deu.edu.tr

§ Bu çalışma, Uluslararası XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (4-8 Kasım 2018, Starlight Hotel & Convention Center, Antalya, Türkiye) iki sözlü bildiri (SS-014 ve SS-015) olarak sunulmuştur.

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

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

GİRİŞ

Candida türleri insanlarda önemli fırsatçı enfeksiyonlara yol açmakta olup, son yıllarda *Candida* kaynaklı enfeksiyonlarda ciddi bir artış izlenmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde yüksek ölüm oranlarının görüldüğü hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının %15'inin *Candida* türlerinden kaynaklandığı rapor edilmiş ve en sık izole edilen tür *C. albicans* olarak bildirilmiştir⁽¹⁾. Deri/mukoza bütünlüğünün bozulması sonucu *Candida* hücreleri, kana epitel hücrelerinden penetrasyon ile girebilir ya da kateter, sonda gibi tıbbi aletlerin üzerinde oluşan biyofilmden yayılabilir. Kan yoluyla ise bütün organların enfekte olabileceği bilinmektedir⁽²⁾. Bu tabloların oluşumunda, konak savunması ve zemin hazırlayan durumlar yanında *Candida* türlerinin virulans faktörleri de önemli rol oynamaktadır. *C. albicans* için tanımlanan virulans faktörleri; adherans, biyofilm üretimi, fenotipik değişim, hücre yüzey fobisitesi, hücre duvar yapısı, sideroforları kullanma yeteneği, yalancı hif-hif-çimlenme borusu oluşumu, moleküler benzeme, fosfolipaz ve proteinaz gibi ekstrasellüler hidrolitik enzimlerin üretimi olarak sıralanabilir⁽³⁾. *C. albicans*'ta fosfolipaz A (PLA), B (PLB), C (PLC), D (PLD), lisofosfolipaz ve lisofosfolipaz transaçilaz olmak üzere altı farklı fosfolipaz enzimi tanımlanmıştır⁽⁴⁾. Fosfolipaz enzimi, hücre membran yapısında bulunan gliserofosfolipitlerin ester bağlarını hidrolize ederek, hücreleri lizise uğratar, doku invazyonuna neden olur. Bunun yanında, hücrenin yüzey özelliklerini değiştirerek enfeksiyonun başlangıcı olan adheransa olanak sağlar⁽¹⁾. Fosfolipaz B'nin hidrolaz ve transaçilaz aktivitesi bulunmakta olup, hidrolaz aktivitesi enzimin yağ asitlerini hem fosfolipitlerden hem de lizofosfolipitlerden ayırmasına neden olurken, transaçilaz aktivitesi enzimin serbest bir yağ asidini bir lizofosfolipite aktararak fosfolipit üretmesine yol açmaktadır⁽⁵⁾. Fosfolipaz C, fosfotidilkolini ve özgün grup olan fosfoinosititi parçalar. Bu tepkime, ökaryot hücrelerin plazma membranındaki reseptörlerle ilişkili sinyal iletiminde önemlidir. Bu aktivasyon, hücre fonksiyonları için önemli olan Ca⁺² iyonlarının bağırsaktan serbest bırakılmasına ve protein kinaz C'nin aktivasyonu

nunu sağlayan 1.2-diaçilgliseritin açığa çıkmasına yol açar ki bu salgılama, hücre büyümesi ve üreme gibi hücresel aktiviteler için zorunlu bir eylemdir⁽⁴⁾. Fosfolipaz D, fosfatidik asit ve kolin üretimini sağlar. PLD geni hem memeli hem de funguslar tarafından kodlanmakta olup, bu enzimin funguslarda mayozun gerçekleşebilmesi için zorunlu olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾.

Ekstrasellüler fosfolipazın *C. albicans*'ın neden olduğu hematogen enfeksiyonların patogenezinde önemli olduğu, yüksek fosfolipaz aktivitesi gösteren izolatların düşük aktivitelilere göre 5.6 kat daha öldürücü olduğu saptanmıştır⁽⁶⁾. Farelerde yapılan başka bir çalışmada, yüksek ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesine sahip *C. albicans* hücrelerinin, düşük aktivite gösterenlere göre oral epitel hücrelerine adheransta ve fareleri öldürme yeteneğinde daha etkili olduğu belirlenmiştir⁽⁷⁾.

Çalışmamızda, kan kültüründen ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatlarının standart plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesinin incelenmesi, her iki grup izolatta en sık üretilen fosfolipaz enzimleri olan fosfolipaz B1, B2, C ve D'nin ekspresyon düzeylerinin ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi ile araştırılması ve gruplar için elde edilen sonuçların karşılaştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 10.09.2015 tarih ve 2242-GOA protokol numaralı 2015/21-24 karar numarası ile onaylanmıştır.

Candida suşları: 01.10.2014-01.12.2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji laboratuvarında kan kültürü (n=30) ve oral kavite örneklerinden (n=30) soyutlanan toplam 60 adet *C. albicans* izolatu çalışmaya alındı. Plak ve RT-PZT yöntemlerinde pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028, plak yönteminde negatif kontrol olarak ise önceki çalışmalarımızda fosfolipaz aktivitesi nega-

tif olarak saptanan bir *C. albicans* izolatı (1519 No.lu izolat) kullanıldı.

Candida albicans izolatları çimlenme borusu deneyi, mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar™ *Candida* (CHROMagar) besiyerlerindeki görünüm ve morfolojileri ile API 20C AUX (BioMérieux SA) kullanılarak tanımlanıp, soyutlanan izolatlar %50 gliserollü beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde stoklanarak -80°C'de saklandı. Daha sonra tüm izolatlar aynı anda açılıp, Sabouraud dekstroz agara (SDA) pasajlanarak canlandırıldı ve fosfolipaz aktivitesi araştırıldı.

Fosfolipaz Aktivitesinin Yumurta Sarılı Besiyerinde Plak Yöntemi ile Araştırılması: Bu amaçla Samaranayake ve ark.⁽⁸⁾ tarafından modifiye edilen Price ve ark.⁽⁹⁾'nın plak yöntemi uygulandı. Besiyeri olarak 0.005 M kalsiyum klorür, 1 M sodyum klorür ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş SDA kullanıldı. SDA besiyerinde üreyen 24 saatlik *Candida* kolonilerinden Mc Farland 1'e uygun bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlandı ve 10'ar µl inoküle edildi. Plaklar 30°C'de nemli ortamda dört gün bekletildi ve koloni çevresinde oluşan presipitasyon zonları kör olarak iki kişi tarafından ölçülerek presipitasyon aktivitesini gösteren Pz değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$Pz \text{ değeri} = \text{Koloni çapı} / \text{Presipitasyon zonu çapı}$

Pz değeri 1.00'a eşit ise izolat fosfolipaz negatif, 1.00'dan küçük ise pozitif olarak kabul edildi.

Fosfolipaz Aktivitesinin Multipleks Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ve Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT) ile Belirlenmesi: *Candida* izolatları YPD besiyerinde 16 saat 37°C ve 150 rpm'de inkübe edildi. Kültür 500 g'de santrifüj edildikten sonra oluşan pelletten RNA izolasyon kiti (YeaStar™ RNA Kit R1002- Zymo Research) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda total RNA ekstraksiyonu yapıldı. Standardizasyon aşamasında ekstrakte edilen total RNA miktarları Nanadrop 2000 Thermo Scientific G118 cihazı ile ölçüldü. Elde edilen RNA'lerden cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand

cDNA Synthesis Kit-Thermo Scientific) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda cDNA sentezi yapıldı. Çalışmaya alınan *C. albicans* izolatlarında dört fosfolipaz geni olan *PLB1*, *PLB2*, *PLC1*, *PLD1*'in ekspresyon düzeylerinin araştırılması amacıyla korunmuş bölgelere özgün sentezlenmiş öncüller^(10,11), iç mRNA kontrolü olarak ise *C. albicans*'ın bir "house keeping" geni olan *ACT1* kullanıldı⁽¹²⁾. Her örnek için *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* öncülleri ile önce multipleks PZT, daha sonra ayrı ayrı RT-PZT *PLB2* ve *PLD1* öncülleri ile ise ayrı RT-PZT uygulandı^(10,11).

PLB1 ve *PLC1* multipleks PZT amplifikasyonu için 50 µl toplam hacim içerisinde 5 µl cDNA olacak şekilde karışım oranları; 5 µl 5xTuneup™ Solution (HelixAmp™), 0.25 µl HelixAmp™ Taq polimeraz, 2 µl dNTP "mix" (herbiri 10mM), ikişer µl (10 pmol) *PLB1*, *ACT1* ve *PLC1* öncülleri (MacroGen) ve 5 µl 10X Taq tampon olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 40 saniye, 55°C 60 saniye, 72°C 1 dakika olmak üzere 35 döngü ve son uzama basamağı için 72°C 7 dakika şeklinde düzenlenerek gerçekleştirildi. Ayrı ayrı *PLB1* ve *PLC1* RT-PZT amplifikasyonu için 50 µl toplam hacim içerisinde 8 µl cDNA olacak şekilde karışım oranları; 1 µl 5xTuneup™ Solution (HelixAmp™) ve diğeri aynı multipleks PZT'de kullanıldığı miktarlarda olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları da yine multipleks PZT için uygulandığı gibi kullanıldı.

PLB2 ve *PLD1* RT-PZT amplifikasyon için aynı *PLB1* ve *PLC1* RT-PZT miktarlarındaki gibi yalnızca 1 µl dNTP "mix" (her biri 10mM) ve aynı miktarda *PLB2*, *ACT1* ve *PLD1* öncülleri (MacroGen) olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları *PLB2*, *ACT1* RT-PZT için 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 50 saniye, 56°C 40 saniye, 72°C 1 dakika olmak üzere 25 döngü ve son uzama basamağı için 72°C 5 dakika şeklinde; *PLD1* RT-PZT için ise 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 40 saniye, 55°C 40 saniye, 72°C 1 dakika olmak üzere 35 döngü ve son uzama basamağı için 72°C 7 dakika şeklinde gerçekleştirildi.

RT-PZT ürünleri, “Gel Red Nucleic Acid” veya “Safeview” gel boyası eklenmiş %1.5 agaroz jelde yürütülerek Vielber Noulmant görüntüleme cihazında görüntülendi. Her suş için elde edilen jel görüntüleri incelendi ve görüntülerin kantitasyonu “Quantity One Software” (Biorad) kullanılarak yapıldı. Daha sonra dört fosfolipaz geni için elde edilen bant kalınlıklarının, iç kontrol olarak kullanılan *ACT1* geni ile karşılaştırılarak normalizasyonu ve *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması yapıldı.

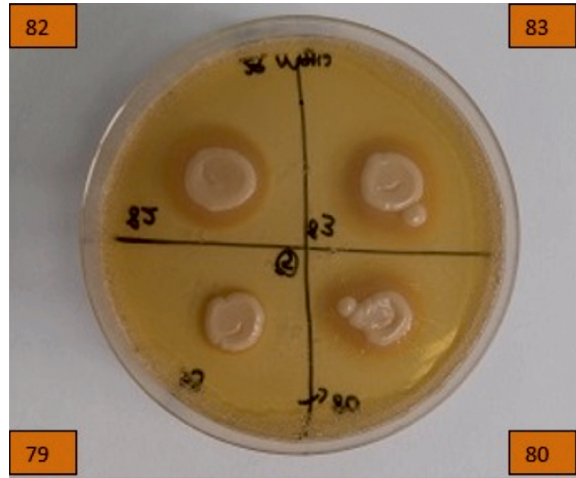
İstatiksel Analiz: Kan kültürü ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatları için plak yöntemi ile belirlenen fosfolipaz olumluluk oranları χ^2 , her iki grubun ortalama Pz değerleri ise Mann Whitney U (SPSS versiyon 22.0) testi; Pz değerleri ile RT-PZT sonucunda elde edilen *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ekspresyon düzeyleri Mann Whitney U ve t test yöntemleri kullanılarak karşılaştırıldı. Bunun yanında, genlerin ekspresyonu ile fenotipik plak yöntemi ile saptanan fosfolipaz pozitifliği arasında % uyum ve Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon, Spearman korelasyon testi ile incelendi (SPSS versiyon 22.0).

BULGULAR

Plak Yönteminin Bulguları: Araştırmamıza alınan tüm *C. albicans* izolatlarının 50 tanesi (%83.3) fosfolipaz olumlu olarak belirlendi. Fosfolipaz aktivitesi saptanan ve saptanmayan *C. albicans* izolatlarının yumurta sarılı SDA’da oluşturdukları koloni ve etrafındaki presipitasyon zonlarının görünümü Şekil 1’de gösterilmiştir.

Plak yöntemi ile kan kültürlerinden soyutlanan izolatların 26’sında (%86.7), oral kavite örneklerinden elde edilen izolatların 24’ünde (%80.0) fosfolipaz aktivitesi saptandı (Tablo 1). Gruplar arasında fosfolipaz olumluluk oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$).

Her iki grupta yer alan fosfolipaz pozitif izolatların plak yöntemi ile belirlenen en küçük, en büyük, ortalama ve ortanca Pz değerleri Tablo 2’de gösterildi.



Şekil 1. Çalışılan üç fosfolipaz olumlu, bir olumsuz (sol üst) *Candida albicans* izolatının yumurta sarılı agarda koloni ve presipitasyon zonlarının görünümü.

Tablo 1. Çalışmaya alınan kan ve oral kavite *Candida albicans* izolatlarının fosfolipaz sonuçları.

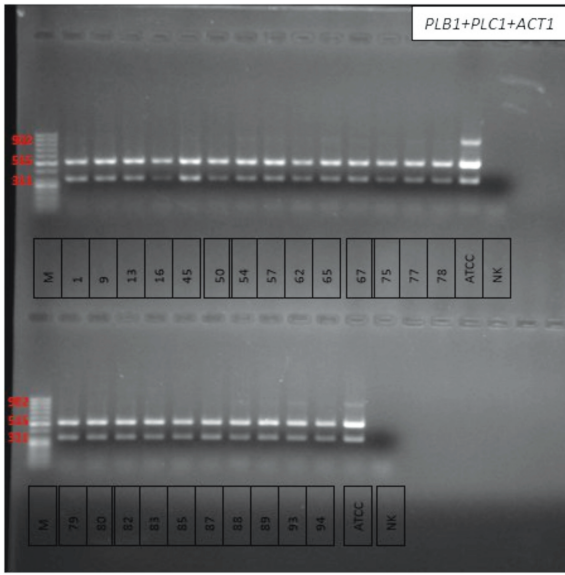
<i>Candida albicans</i>	Toplam (n)	Pozitif izolat sayısı (n) ve oranı (%)	Negatif izolat sayısı (n) ve oranı (%)
Kan	30	26 (86.7)	4 (13.4)
Oral kavite	30	24 (80.0)	6 (20.0)

Tablo 2. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan fosfolipaz pozitif *Candida albicans* izolatlarının plak yöntemi ile belirlenen en küçük, en büyük, ortalama ve ortanca Pz değerleri.

	Kan izolatları Pz değerleri	Oral kavite izolatları Pz değerleri
En küçük	0.42	0.51
Ortanca	0.64	0.70
Ortalama	0.67±0.159	0.76±0.149
En büyük	0.80	0.89

Oral kaviteden soyutlanan *C. albicans* izolatlarının ortalama Pz değeri 0.6988 ± 0.9910 iken; kan kültüründen soyutlanan izolatlarda bu değer 0.6138 ± 0.9823 olarak bulundu. Kan ve oral kavite izolatlarının Pz ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptandı (Mann Whitney U=173.500; $p=0.007$).

RT-PZT Bulguları: Multipleks PZT yöntemi ile çalışılan kan ve oral izolatların tümünde (%100) *PLB1* ve sırasıyla 14 (%23.3) ve 9’unda (%15.0) *PLC1* ekspresyonu belirlendi (Şekil 2). Bu yöntemin görüntülerinde *PLC1* bantlarındaki netlik sorunu nedeni ile daha net bant-



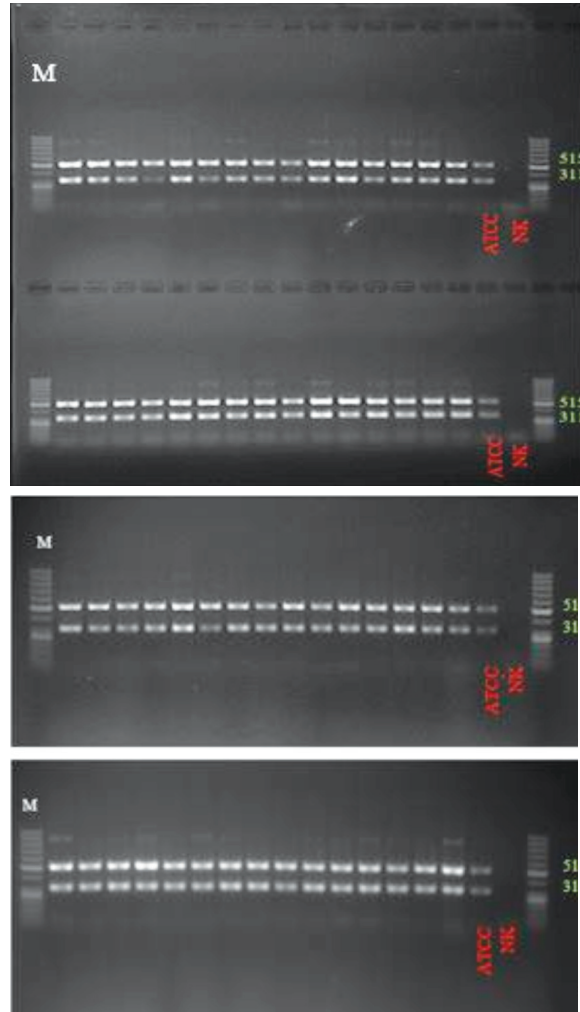
Şekil 2. Kan örneklerinden soyutlanan izolatların *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* gen öncülleri kullanılarak uygulanan multipleks PZT ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik "DNA Ladder"), 515: *ACT1* öncülü, 311: *PLB1* öncülü 902: *PLC1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; "American Type Culture Collection" (ATCC) 90028 suşu, NK: Negatif kontrol.

lar elde edildiği izlenen ayrı RT-PZT testleri standardize edilerek, çalışıldı.

Çalışılan kan ve oral izolatların tümünde (%100) *PLB1*, sırasıyla 29 (%96.7) ve 30 (%100.0)'unda *PLB2*; yine sırasıyla grupların 27'si (%90.0) ve 22'sinde (%73.3) *PLC1*, 27 (%90.0) ve 21 (%70.0)'inde ise *PLD1* ekspresyonu belirlendi (Şekil 3, 4, 5).

Kan ve oral kavite izolatlarının *PLB1* ekspresyon düzeyi ortalamaları sırasıyla 0.7643 ± 0.10753 ve 0.7733 ± 0.11906 olarak saptanmış olup, bu gen ekspresyonu açısından her iki grup izolat arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($t = -0.307$; $p = 0.760$). *PLB2* ekspresyonlarının ortalamaları ise sırasıyla 0.8024 ± 0.14304 ve 0.7250 ± 0.16950 olarak belirlendi ve bu gen düzeyleri kan izolatlarında oral kavite izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Mann Whitney $U = 301.500$; $p = 0.043$). *PLC1* geni için elde edilen ortalamalar yine bu iki grup açısından sırasıyla 0.3015 ± 0.04495 ve 0.3691 ± 0.06858 olarak izlenmiş olup, *PLC1* ekspresyon düzeyi oral kavite izolatlarında, kan izolatlarına göre anlamlı derecede

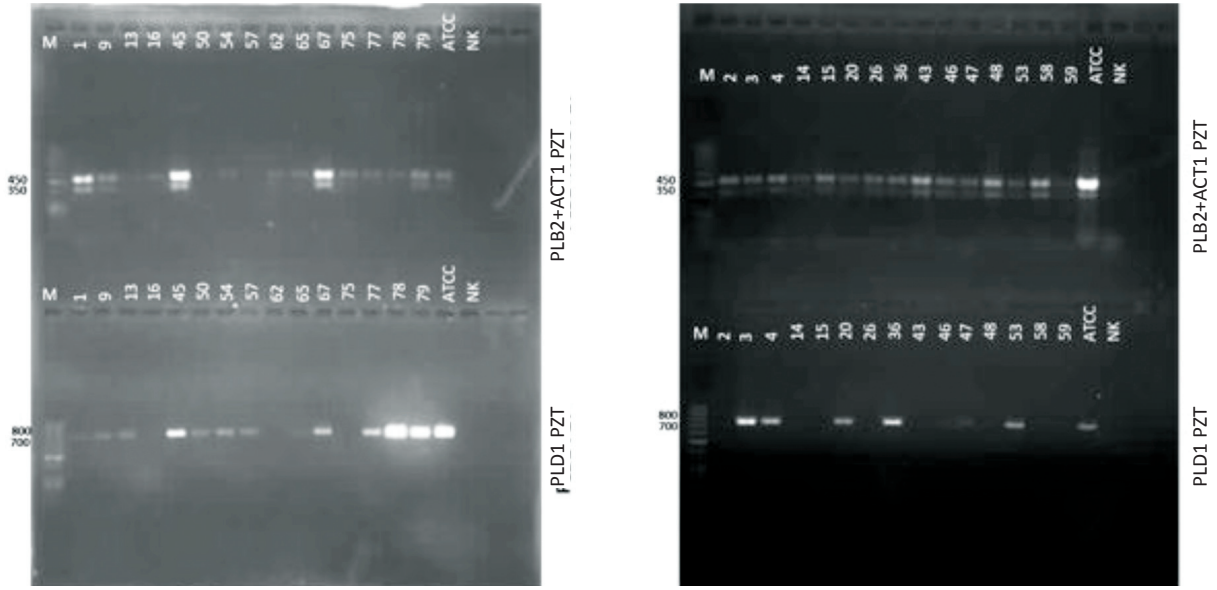


Şekil 3. Kan (üstten birinci) ve oral kavite (üstten ikinci ve üçüncü) izolatlarına *PLB1* ve *ACT1* genleri için uygulanan RT-PZT sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü.

M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik "DNA Ladder"), 515: *ACT1* öncülü, 311: *PLB1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; ATCC 90028 suşu, NK: Negatif kontrol.

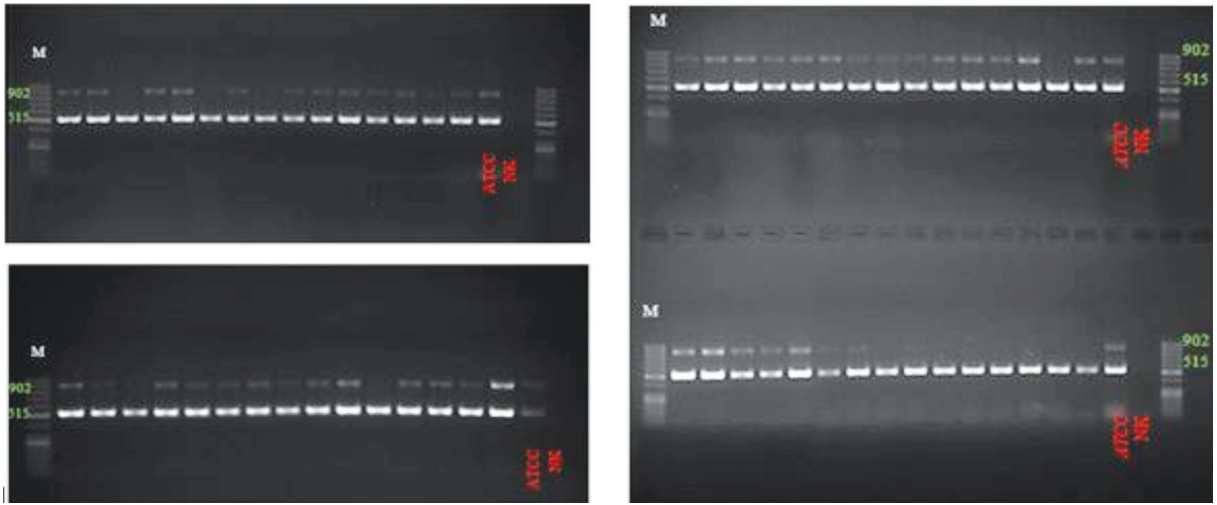
yüksek olarak gözlemlendi (Mann Whitney $U = 103.500$; $p < 0.001$). *PLD1* ekspresyonu ortalaması ise gruplar için sırasıyla 1.1522 ± 0.50434 ve 1.0838 ± 0.43783 olarak belirlendi. *PLD1* ekspresyonu açısından her iki grup izolat arasında istatistiksel bir fark saptanmadı (Mann Whitney $U = 267.000$; $p = 0.732$).

Araştırmaya alınan suşların *PLB1*, *PLB2*, *PLC1*, *PLD1* genleri için kantitasyonların yapılması sonucunda belirlenen sayısal verilerin *ACT1*'e oranlanarak elde edilen normalizasyon değerleri *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ve kan izolatları için sırasıyla 0.51-1.01; 0.62-



Şekil 4. Kan (soldaki) ve oral kavite (sağdaki) izolatlarının *PLB2* ve *PLD1* ile *ACT1* RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntüleri.

M: Marker (*Fermentas SM0371-Generuler 50 baz çiftlik "DNA Ladder"*), 515: *ACT1* öncülü, 401: *PLB2*, 752: *PLD1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; ATCC 90028 suşu, NK: Negatif kontrol



Şekil 5. Kan (soldaki) ve oral kavite (sağdaki) izolatlarının (üstteki ve alttaki) *PLC1* ve *ACT1* RT-PZT ürünlerinin jel görüntüleri.

M: Marker (*Fermentas SM0371-Generuler 50 baz çiftlik "DNA Ladder"*), 515: *ACT1* öncülü, 902: *PLC1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; ATCC 90028 suşu, NK: Negatif kontrol.

1.12; 0.24-0.45 ve 0.32-2.12; oral kavite suşları için ise sırasıyla 0.53-1.02; 0.5-1.13; 0.25-0.52 ve 0.36-1.91 arasında saptandı. Suşların fosfolipaz gen ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırması sonucu bulunan değerlerin ortalama ve standart sapmaları Tablo 3'te gösterildi.

Araştırılan izolatlarda *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1*

ekspresyonunun fenotipik yöntemle sırasıyla %100, %81.7, %71.6, %76.7 oranlarında uyumlu olduğu görüldü. Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı (sırasıyla $p=0.602$; $p=0.555$; $p=0.241$; $p=0.096$). Plak yöntemi ile tüm fosfolipaz genlerinin ekspresyonu arasındaki uyum ise %83.3 olarak belirlendi.

Tablo 3. Çalışmaya alınan izolatların *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 izolatı ile karşılaştırıldığında elde edilen kat değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

Soyutlanan Yer	<i>PLB1</i> ekspresyon değerleri	<i>PLB1</i> EKO±SS	<i>PLB2</i> ekspresyon değerleri	<i>PLB2</i> EKO±SS	<i>PLC1</i> ekspresyon değerleri	<i>PLC1</i> EKO±SS	<i>PLD1</i> ekspresyon değerleri	<i>PLD1</i> EKO±SS
Kan (30)	0.52-1.05	0.79±0.11	0.64-1.65	1.06±0.33	0.35-1.04	0.59±0.31	0.23-2.03	0.85±0.53
Oral kavite (30)	0.70-1.33	0.93±0.15	0.01-1.93	1.16±0.35	0.75-1.33	0.77±0.49	0.33-4.44	1.38±1.12

EKO: Ekspresyon kat oranı, SS: Standart sapma

TARTIŞMA

Candida türleri, hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların yaklaşık %80'inden sorumlu olup, neden olduğu sistemik hastalıklardaki ölüm oranları %36-52 olarak bildirilmiştir^(13,14).

Kandidoz, konak ve maya ile ilişkili faktörlerin etkileşimi sonucu oluşmakta olup, *Candida* türlerinin, başta ekzoenzimler olmak üzere birçok virulans faktörü ile konak savunmasından kaçarak enfeksiyonu başlatabilme özellikleri söz konusudur⁽¹⁵⁾. *C. albicans*'ın diğer türlerden daha fazla olan adhezyon özelliğinin, yüksek oranda fosfolipaz enzimini üreterek, dokulara ve hücrelere invazyonunu artırması nedeni ile olduğu düşünülmektedir⁽¹⁶⁾.

Çalışmamızda kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatlarının fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agarın kullanıldığı plak yöntemi ile incelenmiş, ayrıca moleküler olarak RT-PZT ile fosfolipaz enzimini kodlayan gen bölgeleri araştırılmıştır.

Araştırmamıza alınan 30 kan kökenli *C. albicans* izolatının 26'sında (%86.7) plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesi saptanmış olup, ortalama Pz değeri 0.6138±0.9823 olarak belirlenmiştir. Çalışmamız ile aynı plak yöntemini kullanarak *C. albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesini belirleyen birçok araştırma söz konusudur. Bunlardan birinde, Mattei ve ark.⁽¹⁷⁾ 120 kan kökenli *C. albicans* izolatının %78'inde, Atalay ve ark.⁽¹⁸⁾ *C. albicans* izolatlarının %88.2'sinde fosfolipaz aktivitesi saptamıştır. Mohan ve ark.⁽¹⁹⁾ 37 izolatın %32.45'inin fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini

ve ortalama Pz değerinin 0.66±0.34 olduğunu bildirilmiştir. Gökçe ve ark.⁽²⁰⁾'nin çalışmasında ise, kan dan soyutlanan 68 *C. albicans* izolatının 41 (%60.3)'inde, De Luca ve ark.⁽²¹⁾'nin araştırmasında yine kan kökenli izolatların tümünde (%100) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Price ve ark.⁽⁹⁾; aynı grup kökenlerde plak yöntemi ile %55 oranında fosfolipaz aktivitesi bulmuştur. Çalışmamızda, kan kökenli izolatlar için belirlediğimiz fosfolipaz olumluluk oranı, bazı çalışmalardan yüksek^(17,19,20), bazılarında ise düşüktür^(9,21). Verilerimizin bu çalışmalardaki oranlara göre farklı bulunmasının nedeni kateter gibi predispozan faktörlerin varlığına bakılarak hasta gruplarının oluşturulması, özellikle yoğun bakım üniteleri, yenidoğan üniteleri ve acil serviste yatan hasta örneklerinin çalışmaya dâhil edilmesi ve gruplardaki hastaların klinik tabloları olabilir.

Çalışmamızda 30 oral kavite kökenli *C. albicans* izolatının 24 (%80)'ünde fosfolipaz aktivitesi saptanmış, ortalama Pz değeri 0.6988±0.9910 olarak bulunmuştur. Kumar ve ark.⁽²²⁾ HIV pozitif ve kanserli hastaların oral mukozalarından izole ettikleri izolatlarda %100 oranında fosfolipaz aktivitesi saptamıştır. Sanita ve ark.⁽²³⁾ oral kandidoz enfeksiyonu olan diyabetik, diyabetik olmayan hastalar ve sağlıklı bireylerin oral kavite izolatlarında sırası ile %59.4, %82.8 ve %67.3 oranlarında fosfolipaz aktivitesi belirlemiş olup, ortalama Pz değerleri 0.8632±0.093, 0.8385±0.088 ve 0.9236±0.065 şeklindedir. Kandidemide olduğu gibi oral kandidoz enfeksiyonuna zemin hazırlayan faktörlerin bulunması fırsatçı *C. albicans*'ın patojen duruma geçişini hızlandırmakta ve fosfolipaz aktivasyonunu arttırmaktadır. Koga ve ark.⁽²⁴⁾ HIV'li olguların oral kavite izolatlarında HIV ile enfekte olma duru-

munun fosfolipaz üretimini arttırdığını vurgulamıştır. Bizim oral kavite suşları için bulduğumuz fosfolipaz olumluluk oranı Kumar ve ark.⁽²²⁾'nin çalışmasından düşük olup, bunun nedeni izolatların soyutlandığı olgularda HIV ile enfekte olma durumunun izolatlardaki fosfolipaz üretimini arttırması olabilir.

Bizimle benzer şekilde kan ve oral kavite izolatlarını kapsayan araştırmalarda Costa ve ark.⁽¹⁶⁾ toplam 59 *C. albicans* izolatının 52'sinin (%88.1), oral kavite, kan ve kateter suşlarının sırasıyla %77.4, %46.6 ve %15.4'ünün fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini saptamıştır. Bu çalışmada, oral izolatların fosfolipaz olumluluk oranı kan/kateterden soyutlanan izolatlara göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0.003$). Aynı çalışmada, *C. albicans* izolatlarının soyutlandıkları yer ile fosfolipaz olumlulukları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Çalışmamızda, her iki grup izolattaki fosfolipaz olumluluk oranları arasında anlamlı bir fark belirlenmemiş olup, Costa ve ark.⁽¹⁶⁾ araştırmasına benzer şekilde izolatların soyutlandıkları yer ile fosfolipaz olumlulukları arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($\chi^2=0.48$, $p=0.49$). Öksüz ve ark.⁽²⁵⁾ çeşitli *C. albicans* izolatlarının %53.08'inde fosfolipaz aktivitesi saptamış ve en fazla fosfolipaz aktivitesi gösteren grubun oral kavite (%59) olduğunu bildirmişlerdir. Mandelblat ve ark.⁽²⁶⁾ sistemik izolatların %100'ünde fosfolipaz pozitifliği elde etmiş olup, ortalama Pz değerini 0.548 ± 0.1478 olarak belirlerken, mukozal izolatların %90'ında pozitiflik saptamış ve ortalama Pz değerini 0.629 ± 0.1468 olarak bulmuştur. Aynı çalışmada, sistemik izolatlarda anlamlı olarak yüksek bir olumluluk belirlenmiştir ($p=0.039$). İbrahim ve ark.⁽⁶⁾ *C. albicans* kan izolatlarının komensal oral kavite izolatlarına göre daha fazla ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Kan izolatlarımızın fosfolipaz olumluluk oranı, oral izolatlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen daha yüksektir. Bulgularımız, İbrahim ve ark.⁽⁶⁾ ile Mandelblat ve ark.⁽²⁶⁾ bulguları ile paralel doğrultuda olup, Costa ve ark.⁽¹⁶⁾ ile Öksüz ve ark.⁽²⁵⁾ çalışmaları ile farklılık göstermektedir. Bu durum, seçilen izolat sayısından veya izolatların soyutlandıkları hastaların özelliklerinden kaynaklanabilir.

Örneğin, HIV ile enfekte bireylerin oral kavite izolatlarının daha fazla fosfolipaz ürettiği ve epitel hücrelerine daha fazla adhere olduğu bildirilmiştir^(16,26).

Günümüzde, mantarlarda fosfolipaz aktivitesinin saptanması için yalnızca plak yöntemi yeterli olmakta, bu yöntem ile düşük oranda fosfolipaz üreten izolatlar gözden kaçabilmektedir. Plak yönteminde kullanılan yumurta sarılı agar besiyerinin fosfolipaz pozitif izolatları iyi üretirken, negatif izolatların burada zayıf ürettiği bildirilmiştir. Bu dezavantaj nedeni ile fosfolipaz pozitif ve negatif kökenlerin mRNA seviyelerinin doğrudan karşılaştırılmasının plak yönteminden daha iyi olduğu rapor edilmiştir⁽¹¹⁾. Bu açıdan fosfolipaz varlığının, plak yöntemine göre daha duyarlı olan moleküler teknikler ile araştırılması uygun bir yaklaşım olacaktır. Çalışmamızda, *C. albicans* izolatlarında plak yönteminin yanı sıra fosfolipaz enzimlerini kodlayan *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* genleri RT-PZT ile incelenmiş olup, araştırmamız bu konuda ulaşılabilen Türkiye'de yapılan ilk çalışma olması nedeni ile önemlidir.

Araştırmamızda, öncelikle *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* öncülleri ile multipleks PZT yapılmış, PZT ürünlerinin jel görüntülerinde özellikle *PLC1* bantlarındaki netlik ve standardizasyon sorunu ve bu durumun kantitasyonu etkilemesi nedeni ile yöntemde değişiklik yapılarak, *PLB1* ve *PLC1* ile *ACT1* öncüllerinin kullanıldığı iki ayrı RT-PZT standardize edilerek çalışılmıştır. Bu çalışmada, incelenen 60 *C. albicans* izolatının tümünde (%100) *PLB1*, 59 (%98.3)'ünde *PLB2*, 23 (%38.3)'ünde *PLC1* ve 48 (%80.0)'ünde *PLD1* ekspresyonu gösterilmiştir. *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ekspresyonunun fenotipik yöntemle sırasıyla %100, %81.7, %71.6, %76.7 oranlarında uyumlu olduğu görülmüştür. Samaranayake ve ark.⁽¹⁰⁾, plak yöntemi ile fosfolipaz pozitif altı *C. albicans* izolatlarında *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* varlığını gösterirken, fosfolipaz negatif altı izolatta yalnızca *PLB2* ve *PLD1* genlerinin ekspresyonunu izlemiştir. Çalışmamızda, plak yöntemi ile fosfolipaz negatif dört kan izolatının birinde, altı oral izolatın üçünde *PLD1* ekspresyonu gösterilmemiştir. Bu *PLD1* ekspresyonu izlenmeyen üç izolatın ikisinde

aynı zamanda *PLC1* ekspresyonu da görülmemiş, diğer izolatlarda ise tüm genlerin ekspresyonu saptanmıştır. Naglik ve ark.⁽²⁷⁾ 137 oral ve vajinal kandidozlu hastanın *C. albicans* izolatlarında *PLB1* ve *PLB2* ekspresyonunu araştırmış ve *PLB1* ekspresyonunun oral hastalıkla paralel olduğu belirlemişlerdir. İbrahim ve ark.⁽⁶⁾'nın çalışmasında, oral enfeksiyonlu hastaların izolatlarında saptanan *PLB1* ekspresyonunun, oral taşıyıcı bireylerden soyutlananlara göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Araştırmamızda, Naglik ve ark.⁽²⁷⁾ ile İbrahim ve ark.⁽⁶⁾'nın çalışmasından farklı olarak *PLB1* ekspresyonunun oral enfeksiyon ile ilişkisi izlenmemiş, ancak verilerimiz doğrultusunda *PLB2* ekspresyonunun invaziv enfeksiyonlarda ve her iki çalışmada araştırılmayan *PLC1* geninin oral enfeksiyonlarda önemli olabileceği düşünülmüştür.

Samaranayake ve ark.⁽¹⁰⁾, altı fosfolipaz pozitif izolatta her genin ekspresyonunu göstermişlerdir. Araştırmamızda, kan ve oral kökenlerin hepsinde, farklı olarak tüm genler yerine yalnızca *PLB1* gen ekspresyonu saptanmıştır. Bu durum, çalışmalara alınan izolat sayısındaki farklılık nedeni ile ortaya çıkmış olabilir. Ayrıca çalışmamızda, Samaranayake ve ark.⁽¹⁰⁾'nin sonuçlarına benzer şekilde, 13 oral ve 21 kan izolatının tümünde araştırılan genlerin ekspresyonu gösterilmiştir. Samaranayake ve ark.⁽¹¹⁾, fosfolipaz pozitif gruptaki *C. albicans* izolatlarının yüksek Pz değerine sahip olduğunu, Pz değerleri ile *PLB1* gen ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. Bizim araştırmamızda ise Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Araştırma sonuçlarındaki farklılık çalışılan izolat sayısındaki farktan kaynaklanabilir. Korelasyon bulunmasının nedeni uyguladığımız RT-PZT yönteminin daha duyarlı olması ve plak yönteminde kullanılan besiyerinin fosfolipaz negatif izolatları daha zayıf üretmesi nedeni ile fosfolipaz olumluluğunun net izlenememiş olması olabilir.

Çalışmamızda, oral kavite ve kan örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatlarında yüksek oranlarda fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi, bu enzimlerin

üretiminin virulans açısından önemli bir rol oynadığını desteklemekte olup, bulgularımız doğrultusunda *PLB2* ve *PLC1* enzimlerinin sırasıyla invaziv ve oral enfeksiyonlarda daha etkin olduğu söylenebilir, ancak bu konuda kesin bir sonuca varmak için daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim söz konusudur.

Teşekkür

Bu araştırma TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (1002) tarafından 116S136 numaralı proje ile desteklenmiştir. Teşekkürlerimizi sunarız.

Etik Kurul Onayı: Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 10.09.2015 tarih ve 2242-GOA protokol numaralı 2015/21-24 karar numarası ile onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: TÜBİTAK 1002/116S136

Ethics Committee Approval: It was approved by the Non-Interventional Research Ethics Committee of Dokuz Eylül University with the decision number of 2242-GOA dated 10.09.2015 and the decision number of 2015 / 21-24.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest.

Funding: TUBITAK 1002/116S136

KAYNAKLAR

1. Ying S, Chunyang L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. *Mycoses*. 2012;55(1):50-5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02024.x>
2. Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: Epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):863-74. <https://doi.org/10.2174/138945005774912735>
3. Martinez JP, Gil ML, Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(1):121-41.
4. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001;44:361-7. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x>

5. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):122-43.
<https://doi.org/10.1128/cmr.13.1.122-143.2000>
6. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1995;63(5):1993-8.
<https://doi.org/10.1128/IAI.63.5.1993-1998.1995>.
7. Ellepola ANB, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following bries exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses.* 2014;57(9):553-9.
<https://doi.org/10.1111/myc.12194>.
8. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity in *Candida* species in vitro. *Sabouraudia.* 1984;22(3):201-7.
9. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982;20(1):7-14.
<https://doi.org/10.1080/00362178285380031>
10. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BPK et al. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS.* 2006;114(12):857-66.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_479.x
11. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JA et al. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virüs infection. *J Med Microbiol.* 2005; 54:583-93.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.45762-0>
12. Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;44(10):2693-700.
<https://doi.org/10.1128/aac.44.10.2693-2700.2000>
13. Sriphanam C, Nuanmuang N, Saengsawang K, Amornthipayawong D, Kummasook A. Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *J Mycol Med.* 2019;29(4):325-30.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.08.001>
14. Jaeger M, Matzaraki V, Aguirre-Gamboa R et al. A genome-wide functional genomics approach identifies susceptibility pathways to fungal bloodstream infection in humans. *J Infect Dis.* 2019;220(5):862-72.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz206>
15. Menezes RP, Riceto EBM, Borges AS, Brito Röder DVD, Pedroso RS. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Arch Oral Biol.* 2016; 66:61-5.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.004>
16. Costa CR, Passos XS, Souza LKH, Lucena PA, Fernandes OFL, Silva MRR. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheher, blood and oral cavity. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2010;52(3):139-43.
<https://doi.org/10.1590/s0036-46652010000300005>
17. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli LS, Oliveira FM, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(3):340-2.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0045-2013>
18. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood culture. *Niger J Clin Pract.* 2015;18(1):52-5.
<https://doi.org/10.4103/1119-3077.146979>
19. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(4):208-10.
[https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70050-0](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70050-0)
20. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.* 2007;164(6):265-9.
<https://doi.org/10.1007/s11046-007-9053-4>
21. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Clabro M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol.* 2012;35(4):459-68.
22. Kumar CPG, Kumar SSS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia.* 2006;161(4):213-8.
<https://doi.org/10.1007/s11046-005-0157-4>
23. Sanita PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. *Mycoses.* 2014;57(6):351-7.
<https://doi.org/10.1111/myc.12162>
24. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia.* 2006;161(4):219-23.
<https://doi.org/10.1007/s11046-005-0001-x>
25. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, et al. Phospholipase and proteinase activities in different

- Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. Jpn J Infect Dis. 2007;60(5): 280-3.
26. Mandelblat M, Frenkel M, Abbey D, Ami RB, Berman J, Segal E. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. Mycoses. 2017;60(8):534-45.
- <https://doi.org/10.1111/myc.12623>
27. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J Infect Dis. 2003;188(3):469-79. <https://doi.org/10.1086/376536>

Gastroduodenal Yakınmaları Olan Hastaların Dışkı Örneklerinde *Helicobacter pylori* Antijen Pozitifliğinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi

Retrospective Evaluation of *Helicobacter pylori* Antigen Positivity in the Stool Samples of Patients with Gastroduodenal Complaints

Tevhide Ziver Sarp*¹, Harika Öykü Dinç**¹, Doğan Özbey***¹, Seher Akkuş****¹, Beyza Aslan***¹,
Merve Cihan***¹, Nesrin Gareayaghi****¹, Hrisi Bahar Tokman***¹, Suat Sarıbaşı****¹,
Bekir Kocazeybek***¹

*Doğu Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Gazimağusa, K.K.T.C.

**Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

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

****Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Şişli Hamidiye Etfal Eğitim Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, İstanbul, Türkiye

Atf/Cite as: Ziver Sarp T, Dinç HÖ, Özbey D, Akkuş S, Aslan B, Cihan M, Gareayaghi N, Tokman HB, Sarıbaşı S, Kocazeybek B. Gastroduodenal yakınmaları olan hastaların dışkı örneklerinde *Helicobacter pylori* antijen pozitifliğinin retrospektif olarak değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):61-9.

Öz

Amaç: *Helicobacter pylori* akut ve kronik gastrit, ülser ve gastrik kanser gibi önemli gastroduodenal patolojilerin gelişmesine neden olan önemli bir patojen olup, dünya nüfusunun yaklaşık yarısını enfekte ettiği tahmin edilmektedir. Bu çalışmada, Ocak 2015-Aralık 2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji/ELISA laboratuvarına gastroduodenal yakınmaları ile başvuran hastalardan alınan gaita örneklerinde *H. pylori* antijen varlığı araştırılarak, beş yıllık verilerin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Ocak 2015-Aralık 2019 tarihleri arasında, gastroduodenal yakınmaları ile hastaneye başvuran 4696 hastanın gaita örneği monoklonal antikor içeren immunokromotografik *H. pylori* dışkı antijen testi kullanılarak incelendi.

Bulgular: Beş yıllık sürede retrospektif olarak incelemeye alınan, 4.696 hastanın 1.176'sında (%25) *H. pylori* test sonucu pozitif bulunurken, 3.520'sinde (%75) negatif bulunmuştur. Dokuz yüz seksen altı çocuğun 210'unda (%21,30), 3.710 erişkinin ise 966'sında (%26,04) *H. pylori* pozitif saptanmıştır. *H. pylori* saptanma oranı yetişkinlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p=0,002$). Otuz-otuz dokuz yaş aralığında *H. pylori* pozitifliği diğer yaş gruplarına göre daha yüksek saptanmıştır.

Sonuç: Çalışma sonuçlarımız son yıllarda yapılan prevalans çalışmalarının sonuçlarına göre daha düşük bulunmuş olsa da *H. pylori*'nin gastroduodenal yakınmaları olan tüm yaş gruplarında önemli bir patojen olduğu ve toplum içerisinde izlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori*, prevalans, *H. pylori* dışkı antijen testi

ABSTRACT

Objective: *Helicobacter pylori* is an important pathogen that causes the development of important gastroduodenal pathologies such as acute and chronic gastritis, ulcer and gastric cancer. This pathogen is estimated to infect about half of the world's population. In this study, it was aimed to evaluate the five-year data retrospectively by investigating the presence of *H. pylori* antigen in stool samples taken from patients who applied to Istanbul University-Cerrahpaşa Medical Faculty Medical Microbiology Department Serology/ELISA laboratory with gastroduodenal complaints between January 2015 and December 2019.

Method: Stool specimens of 4696 patients admitted to the hospital with gastroduodenal complaints between January 2015 and December 2019 were analyzed using an immunochromatographic *H. pylori* stool antigen test containing monoclonal antibodies.

Results: Among 4696 patients who were examined retrospectively in a five-year period, 1176 (25%) had positive, and 3520 (75%) of them negative *H. pylori* test results. *H. pylori*-positivity was found in 210 (21.30%) of 986 children and 966 (26.04%) of 3710 adults. *H. pylori* detection rate in children was found to be significantly lower than adults ($p: 0.002$). *H. pylori* positivity was found higher in the 30-39 age range compared to other age groups.

Conclusion: Although current study results showed a lower prevalence compared to recent studies, it has been concluded that *H. pylori* is an important pathogen in all age groups with gastroduodenal complaints and should be monitored in the community.

Keywords: *Helicobacter pylori*, prevalence, *H. pylori* stool antigen test

Alındığı tarih / Received:

03.07.2020 / 03.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:

04.12.2020 / 04.December.2020

Yayın tarihi / Publication date:

31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

T. Ziver Sarp 0000-0002-7338-1292
H. Ö. Dinç 0000-0003-3628-7392
D. Özbey 0000-0002-0596-1551
S. Akkuş 0000-0002-9236-2062
B. Aslan 0000-0001-5986-4645
M. Cihan 0000-0002-0075-051X
N. Gareayaghi 0000-0002-0812-1128
H. B. Tokman 0000-0002-2205-5120
S. Sarıbaşı 0000-0002-4549-3887
B. Kocazeybek 0000-0003-1072-3846

✉ bzeybek@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Helicobacter pylori, Gram negatif, spiral şekilli, mikroaerofil bir bakteri olup, asidik ortama ve kalın musin tabakasına rağmen midenin antrum ve korpus bölgesine kolonize olan önemli bir patojendir⁽¹⁾. *H. pylori*, enfekte kişilerin mide mukozasında asemptomatik kolonizasyonunun yanı sıra akut ve kronik gastrit, peptik-duodenal ülser, gastrik kanser ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması (MALT lenfoma) gibi önemli gastroduodenal patolojilerin gelişmesine yol açmaktadır^(1,2). Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC-International Agency for Research on Cancer Working Group) bakteriyi birinci sınıf karsinojen olarak tanımlamıştır⁽³⁾.

Dünya nüfusunun yaklaşık yarısının *H. pylori* ile enfekte olduğu tahmin edilmekte ve patojen mikroorganizmanın çocukluk çağında kazanıldığı düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, *H. pylori*'nin görülme sıklığının toplumların gelişmişlik düzeyleri ile ilişkili olduğunu ve yaşla birlikte arttığını göstermektedir. Bulaş yolu kesin olarak bilinmemekle birlikte, bakterinin oral-oral ve oral-fekal yol aracılığı ile bulaştığı tahmin edilmektedir^(1,2,4).

Bakteri tanısı için endoskopik biyopsi ile alınan örneklerden yapılan kültür, histopatolojik incelemeler, hızlı üreaz testi ve polimeraz zincir reaksiyonu gibi invaziv yöntemlerin yanı sıra gaitada antijen testi ve üre nefes testi gibi non-invaziv yöntemler kullanılmaktadır^(1,5). Son yıllarda *H. pylori* tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan, invaziv yöntemlere performans açısından alternatif olabilen, güvenilir, daha ucuz, daha hızlı sonuç veren, monoklonal antikoların kullanıldığı *H. pylori* gaita antijen (*H. pylori* stool antigen; HpSa) ELISA testlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır^(3,6). Duyarlılığı ortalama %96 olan monoklonal antikor temelli antijen testleri immunokromatografik yöntem ile çalışmakta olup, özellikle toplumsal kitle seroprevalans taramalarında hızlı ve güvenilir olması açısından tercih edilen yöntemlerdendir^(6,7). Son yıllarda sık göç alan ve

nüfus yoğunluğuna bağlı sosyoekonomik dengesizliklerin yoğun olduğu İstanbul'da *H. pylori* prevalansının belirlenmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, Ocak 2015-Aralık 2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji/ELISA Laboratuvarı'na gastroduodenal yakınmalar ile başvuran hastalardan alınan gaita örneklerinde *H. pylori* antijen varlığı araştırılarak, beş yıllık verilerin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Ocak 2015-Aralık 2019 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'ne gastroduodenal yakınmalar ile başvuran ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji/ELISA laboratuvarından taze dışkı örneklerinde *H. pylori* antijen test istemi yapılan 4696 hasta ile yürütülmüştür. Çalışmaya dâhil edilen hastalar 1-78 yaş aralığında olup, çeşitli poliklinik ve servislerde tedavi gören, klinik bulgular açısından kuşkulu değerlendirilen hastalar idi. Hastalardan alınan dışkı örnekleri kalitatif immunokromatografi temeline dayalı, monoklonal antikor kullanımı ile dışkıda *H. pylori* dış membran proteinlerini araştıran *H. pylori* dışkı antijen testi (CerTest *H. pylori* One Step Card Test, CerTest Biotec, İspanya) kullanılarak incelendi. Firma verilerine göre analiz için kullanılan testin duyarlılığı %98.2, özgüllüğü ise %98.4 olarak belirtilmektedir.

Test üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Dışkı örnekleri teste ait, içerisinde özel bir solüsyon bulunan tüplerin içerisine aktararak homojenize olana dek karıştırıldı. Bu karışımdan dört damla alınarak test kartının pencere kısmına damlatıldı. Test sonucu 10 dakika bekletildikten sonra firma önerileri doğrultusunda oluşan bantlara göre değerlendirildi. Strip üzerinde yalnızca kontrol (C) kısmında yeşil bantın oluşması sonucun negatif, hem kontrol (C) kısmında yeşil hem test (T) kısmında kırmızı bant oluşması ise sonucun pozitif olduğunu göstermektedir.

Araştırma verileri frekans ve ki-kare testi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.08.2020 tarih ve 83045809-604.01.02 sayılı karar doğrultusunda etik kurul onayı alınarak uygulanmıştır.

BULGULAR

Bu çalışma; gastroduodenal yakınmalar ile Ocak 2015-Aralık 2019 tarihleri arasındaki beş yıllık sürede hastanemize başvuran ve retrospektif değerlendirme kapsamına alınan 4.696 hasta ile yürütülmüştür. Çalışmaya dâhil edilen çocuk (<18 yaş) ve yetişkin (≥ 18 yaş) hastaların başvurdukları kliniklere göre dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir. Değerlendirme kapsamına alınan 4.696 hastanın 986'sı (%21) çocuk, 3.710'u (%79) ise yetişkindir. Hastaların başvurdukları kliniklere göre dağılımı incelendiğinde %46.15'inin iç hastalıkları, %23.17'sinin deri ve zührevi hastalıklar, %2.19'unun ise çocuk servis/polikliniğinden olduğu saptanmıştır.

Hastaların yaş, cinsiyet ve test tarihlerine göre dağılımları Tablo 2'de gösterilmiştir. Yaşları 1-78 arasında değişen 4.696 hastanın 2.887'si kadın (%61.48) ve 1.809'u erkektir (%38.52). Buna göre 5 yıllık süre içerisinde kadınların erkeklere göre daha fazla test başvurusunda bulunduğu, 30-39 yaş arasındaki bireylerin test başvurularının diğer yaşlara kıyasla daha

yoğun olduğu ve yıllara göre incelendiğinde 2017 yılında test isteminin diğer yıllara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır.

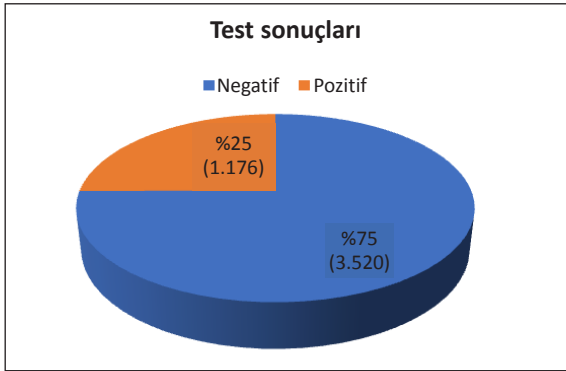
Tablo 2. Hastaların demografik özelliklerine göre dağılımı (n=4696).

	n	%
Cinsiyet		
Kadın	2887	61.48
Erkek	1809	38.52
Yaş grubu (=39.36±16.31)		
1-9 Yaş	178	3.79
10-19 yaş	328	6.98
20-29 yaş	869	18.51
30-39 yaş	1033	22.00
40-49 yaş	943	20.08
50-59 yaş	799	17.01
60-69 yaş	386	8.22
70> yaş	160	3.41
Test tarihi		
2015	1043	22.21
2016	930	19.80
2017	1540	32.79
2018	678	14.44
2019	505	10.75
Toplam	4696	100.00

Hastaların klinik dağılımlarına göre test sonuçlarının dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir. Buna göre iç hastalıkları servis ve polikliniğine başvuran hastaların 534'ünde (%45.41), deri ve zührevi hastalıklar servis ve polikliniğine başvuran hastaların 339'unda (%28.83), çocuk servisine başvuran hastaların 13'ünde (%1.11) *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır.

Tablo 1. Hastaların başvurdukları kliniklere göre dağılımı (n=4696).

Birim	<18		≥ 18		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Genel Cerrahi	6	0.61	41	1.11	47	1.00
Nöroloji	2	0.20	12	0.32	14	0.30
Gastroenteroloji	81	8.22	421	11.35	502	10.69
İç Hastalıkları	333	33.77	1834	49.43	2167	46.15
Kulak-Burun-Boğaz	244	24.75	444	11.97	688	14.65
Deri ve Zührevi Hastalıklar	180	18.26	908	24.47	1088	23.17
Geriyatri	0	0.00	7	0.19	7	0.15
Aile Hekimliği	4	0.41	12	0.32	16	0.34
Göğüs Hastalıkları	2	0.20	21	0.57	23	0.49
Kadın Hastalıkları	1	0.10	8	0.22	9	0.19
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	103	10.45	0	0.00	103	2.19
Kardiyoloji	30	3.04	2	0.05	32	0.68
Toplam	986	100.00	3710	100.00	4696	100.00



Şekil 1. Hastaların test sonucuna göre dağılımları.

Araştırmaya katılan 986 çocuğun %21.30'unda, 3.710 yetişkinin ise %26.04'ünde *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Çocuklarda *H. pylori* pozitif saptanma oranı yetişkinlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p=0.002$) (Tablo 4).

Çalışmaya alınan hastaların cinsiyet ve test istem tarihlerine göre test sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 5'te verilmiştir. Araştırmaya katılan kadın hastaların 725'inde (%25.11), erkek hastaların ise 451'inde (%24.93) *H. pylori* pozitifliği saptanmış olup, hastaların cinsiyetlerine göre test sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Hastaların test yaptırdığı yıllara göre test sonuçları incelendiğinde, 2015 yılında 1.043 hastanın 169'unun (%16.20), 2016 yılında 930 hastanın 136'sının (%14.62), 2017 yılında 1.540 hastanın 567'sinin (%36.82), 2018 yılında 678 hastanın 233'ünün (%34.37) ve 2019 yılında 505 hastanın 71'inin (%14.06) test sonuçları pozitif çıkmıştır. 2017 ve 2018 yıllarında test sonuçlarının pozitif çıkma oranı diğer yıllara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 5).

Tablo 3. Hastaların başvurduğu kliniğe göre test sonuçlarının dağılımı.

Birim	Negatif		Pozitif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Genel Cerrahi	37	1.05	10	0.85	47	1.00
Nöroloji	12	0.34	2	0.17	14	0.30
Gastroenteroloji	401	11.39	101	8.59	502	10.69
İç Hastalıkları	1633	46.39	534	45.41	2167	46.15
Kulak-Burun-Boğaz	526	14.94	162	13.78	688	14.65
Deri ve Zührevi Hastalıklar	749	21.28	339	28.83	1088	23.17
Geriyatri	5	0.14	2	0.17	7	0.15
Aile Hekimliği	14	0.40	2	0.17	16	0.34
Göğüs Hastalıkları	22	0.63	1	0.09	23	0.49
Kadın Hastalıkları	6	0.17	3	0.26	9	0.19
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	90	2.56	13	1.11	103	2.19
Kardiyoloji	25	0.71	7	0.60	32	0.68
Toplam	3520	100.00	1176	100.00	4696	100.00

Tablo 4. Hastaların çocuk/yetişkin olma durumlarına göre test sonuçlarının karşılaştırılması.

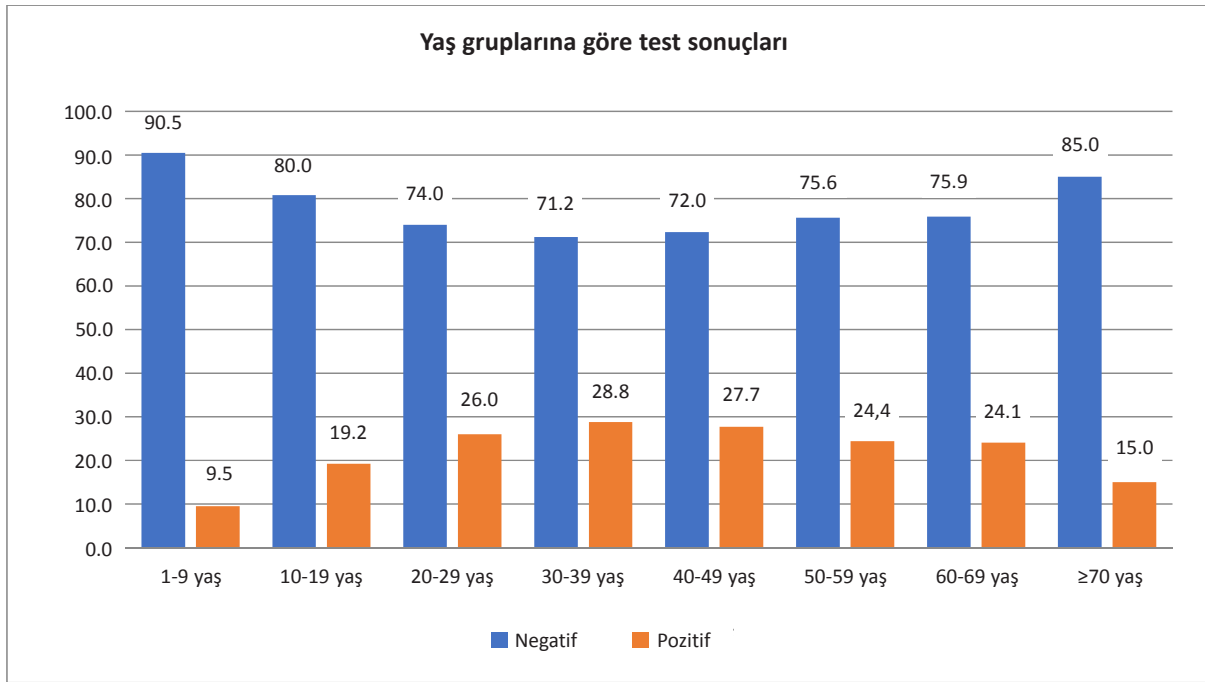
Birim	Negatif		Pozitif		χ^2	p
	n	%	n	%		
<18	776	78.70	210	21.30	9.322	0.002*
≥18	2744	73.96	966	26.04		
Toplam	3520	74.96	1176	25.04		

* $p<0.05$

Tablo 5. Hastaların cinsiyet ve test istem tarihlerine göre test sonuçlarının karşılaştırılması (n=4696).

	Negatif		Pozitif		χ^2	p
	n	%	n	%		
Cinsiyet					0.020	0.889
Kadın	2162	74.89	725	25.11		
Erkek	1358	75.07	451	24.93		
Yıl					274.805	0.000**
2015	874	83.80	169	16.20		
2016	794	85.38	136	14.62		
2017	973	63.18	567	36.82		
2018	445	65.63	233	34.37		
2019	434	85.94	71	14.06		

** $p<0.01$



Şekil 2. Hastaların yaş gruplarına göre test sonuçlarının dağılımı.

TARTIŞMA

Helicobacter pylori, tüm dünyada yaygın olarak görülen enfeksiyon etkenlerinden biri olup, geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülmektedir. Düşük sosyoekonomik düzey ve kalabalık yaşam şartları enfeksiyon gelişme riskini kolaylaştırmaktadır. Bakteri genellikle çocukluk çağında kazanılmakta ve prevalansı yaşla birlikte giderek artış göstermektedir^(1,8-10).

Helicobacter pylori, enfeksiyonunun tespiti ve eradikasyonunun değerlendirilmesinde ve toplumsal kitle seroprevalans taramalarında son yıllarda non invaziv testlerden gaitada *H. pylori* antijen testi sıklıkla kullanılmaktadır. Monoklonal antikorların kullanıldığı one step immunokromotografik formattaki testlerin özgüllüğü ve duyarlılığı altın standart testlerle kıyaslandığında oldukça yüksek bulunmuştur^(6, 8,11-13). Monoklonal antikorların kullanıldığı test sonuçlarının duyarlılık ve özgüllüğünün incelendiği 48 çalışmanın sonuçlarının irdelendiği bir metaanalizde sonuçlar sırası ile %94-98 ve %95-98 arasında bulunmuştur⁽¹⁴⁾.

Helicobacter pylori pozitifliği toplumlara ve yaş gruplarına göre değişkenlik göstermekle birlikte gelişmiş olan toplumlarda prevalansın daha düşük olduğu bildirilirken, gelişmekte olan ülkelerde sosyoekonomik koşulların yetersizliği, sağlıklı beslenme ve hijyen kurallarının sağlanamaması nedeni ile 5-10 yaş çocuklarda %60, yetişkinlerde ise %70 civarında prevalans bildirilmektedir^(11,15). Çin'in Guangzhou kentinde 1993-2003 yılları arasında yapılan seroprevalans çalışmasında pozitifliğin %62.5'ten %49.3'e düştüğü saptanırken⁽¹⁶⁾, Schwizer ve ark.'nın⁽¹⁷⁾ 2013 yılında İsviçre, Almanya, İngiltere ve Avusturya gibi ülkelerin dâhil olduğu çok merkezli yürüttüğü çalışmada incelenen 589 hastanın %34'ünde pozitiflik saptanmıştır. Mısır'da dispeptik yakınmaları olan hastalarla yapılan çalışmada %32 oranında⁽¹⁸⁾, Belçika'da ise %74 oranında⁽¹⁹⁾, Çek Cumhuriyeti'nde %41.2, Danimarka'da %22.1, İzlanda'da %36, İngiltere'de %35.5, İtalya'da %56.2, İspanya'da %54.9, Almanya'da %35.3, Brezilya %71.2, Amerika'da %35.6, İran'da %59, Hollanda'da %35.5 *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır⁽²⁰⁾. Hooi ve ark.'nın⁽²⁰⁾ 2017 yılında 62 ülkeden 531,880 katılımcının yer aldığı meta analizde, %48.5 oranında *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada,

Afrika'da %70.1, Güney Amerika'da %69.4, Batı Asya'da %66.6, Okyanusya'da %24.4, Batı Avrupa'da %34.3, Kuzey Amerika'da %37.1 oranında *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır⁽²⁰⁾. Çalışmamızda, gastroduodenal yakınmalar ile laboratuvarımıza başvuran 1-78 yaş arasında değişen 4.696 hastanın %25'inde *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Bu oran birçok ülke prevalansına kıyasla daha düşük olmakla birlikte, bazı Batı ülkelerindeki prevalansa benzerlik göstermektedir.

Türkiye'ye *H. pylori* ile ilgili yapılan çalışmalarda %44-73 arasında bölgelere ve yaş gruplarına göre değişkenlik gösteren prevalans dağılımı olduğu, yaşla birlikte görülme oranının artış gösterdiği ve son yıllarda görülme oranlarında azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir⁽¹⁰⁻¹²⁾. Ülkemizde *H. pylori* prevalansını inceleyen en kapsamlı çalışma 2013 yılında yapılan TURHEP çalışmasıdır. Bu çalışmada, 18 yaş üstü 5.549 kişiye ¹³C üre nefes testi uygulanmış ve %82.5 *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Prevalans en yüksek Türkiye'nin doğu bölgesinde %88 oranında saptanırken, en düşük güney bölgesinde %79 oranında saptanmıştır. Türkiye'nin merkezinde *H. pylori* pozitifliği %85, kuzey bölgesinde %82.3, batı bölgesinde ise %80.3 olarak bildirilmiştir⁽²¹⁾. Yapılan bir metaanalizde, Türkiye'deki prevalans oranı %77.2 olarak saptanmıştır⁽²⁰⁾. 2017 yılında Türkiye'de yapılan bir araştırmada, *H. pylori* prevalansı %75.7 saptanırken, bölgelere göre dağılımı incelendiğinde, Marmara bölgesinde %71.8, Ege bölgesinde %68.5, Karadeniz bölgesinde %66.7, İç Anadolu bölgesinde %80.9, Akdeniz bölgesinde %85.6, Doğu Anadolu bölgesinde %83.8 ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde %88.7 oranında pozitiflik saptanmıştır⁽²²⁾.

İstanbul'da 1999-2003 yılları arasında retrospektif olarak yapılan çalışmada *H. pylori* sıklığı %62.7⁽²³⁾, 2005 yılında yaşları 2-48 yaş arası değişen 445 hasta ile yapılan çalışmada, *H. pylori* pozitifliği %36.6 saptanmıştır⁽²⁴⁾. Yine İstanbul'da 2008-2010 yılları arasında yaş ortalamaları 44.76±14.20 olan 2.052 hastanın % 44.8'inde *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır⁽²⁵⁾. Trakya bölgesinde 2003-2007 yılları arasında gastroduodenal yakınmaları olan 4.714 hasta ile

yapılan çalışmada *H. pylori* sıklığı %52.8 olarak bulunmuştur⁽²⁶⁾. 2003-2018 yılları arasında yapılan prevalans çalışmalarında, Kırşehir'de %25.2⁽¹¹⁾, Konya'da %58.2⁽¹²⁾, Sivas'ta %70.1⁽²⁷⁾, Samsun'da %78.46⁽²⁸⁾, İzmir'de %10.9⁽²⁹⁾, Erzurum'da %57.7⁽³⁰⁾, Şanlıurfa'da %71⁽³¹⁾, Ankara'da %68⁽³²⁾, Diyarbakir'da %65⁽³³⁾ *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz %25 *H. pylori* pozitifliği, ülkemizde farklı bölgelerde ve İstanbul'da önceki yıllarda yapılan çalışmaların çoğuna göre daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin İstanbul'un hijyen ve sanitasyon koşullarının iyileşmesi, ekonomik ve eğitim seviyesinin yükselmesi gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, birçok çalışmada olduğu gibi cinsiyetler arasında *H. pylori* pozitifliği yönünden anlamlı bir farklılık saptanmamıştır^(10,11,21,30,31,34). Hastaların başvurdukları kliniklere göre test sonuçları değerlendirildiğinde, iç hastalıkları poliklinik ve servislerine başvuran %46.15 hastanın %45.41'inin testinin pozitif, deri ve zührevi hastalıkları poliklinik ve servisine başvuran %23.17 hastanın %28.83'ünün testinin pozitif olduğu belirlenmiştir. Klinik ve servislerden talep edilen test sayısı ile pozitiflik oranları arasında paralellik bulunmaktadır. Yıllara göre test sonuçlarının dağılımı incelendiğinde, 2017 ve 2018 yıllarında *H. pylori* pozitifliği diğer yıllara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu sonucun İstanbul'un sık göç alan bir şehir olması ve yıllara göre popülasyon dinamiğinin sürekli değişkenlik göstermesine bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

Helicobacter pylori enfeksiyonları gelişmekte olan ülkelerde ve ülkemizde çocukluk yaşlarından itibaren kazanılmakta ve yaş ile birlikte artış göstererek yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Çocukluk döneminde *H. pylori* seroprevalansının düşük olduğu, ancak aile içinde bulunan yetişkinlerde antikor oranlarının yüksek olmasına bağlı olarak kazanıldığı düşünülmektedir. Her ne kadar *H. pylori*'nin insandan insana bulaştığı yönünde net veriler olmasa da aile içi oral-oral

veya oral-fekal yollarla çocukların etkeni kazandığı bilinmektedir^(1,9,11,35,36).

Gelişmiş ülkelerde çocukluk döneminde *H. pylori* pozitifliği %0-5 arasında saptanırken, yetişkinlerde bu oran %30-50 arasında değişkenlik göstermektedir. Türkiye'nin de içinde bulunduğu gelişmekte olan ülkelerde ise bu oranlar çocukluk döneminde %60-70 civarında iken, yetişkinlerde %85-90 arasında bildirilmektedir^(8,37). Çalışmamızda, 986 çocuk, 3710 yetişkin *H. pylori* yönünden değerlendirilmiştir. Çocukların %21.30'unda, yetişkinlerin ise %26.04'ünde *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Çocuklarda *H. pylori* pozitif saptanma oranı yetişkinlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p=0.02). Bu sonuç literatür verileri ile benzer görünüm sergilemektedir^(1,9,11,35).

Rusya'dan Tkachenko ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ çocuklar üzerinde 10 yıl ara ile yapmış olduğu kesitsel bir çalışmada, 1995 yılından 2005 yılına dek *H. pylori* pozitifliğinin %44'ten 13'e düştüğü belirlenirken, çocuklarda İtalya'da %22⁽³⁸⁾, Bangladeş'te %42-67⁽³⁹⁾, Yemen'de %8.9, Ürdün'de %55.5, Tayvan'da %21.5, Afrika'da %72.8⁽³⁴⁾ ve İsrail'de %49.7⁽³⁷⁾ *H. pylori* pozitifliği bildirilmiştir. Ülkemizde Kırşehir ilinde 1-9 yaş arası çocukların %16.6'sının, 10-19 yaş çocukların ise %25'inin⁽¹¹⁾, Samsun'da çocukların %79.5'inin⁽²⁸⁾, Erzurum'da 1-18 yaş çocukların incelendiği bir çalışmada, 1-5 yaş arası çocukların %57.14'ü, 6-10 yaş çocukların %56.25'inin ve 11-18 yaş çocukların %63.88'inin⁽³⁴⁾, Zonguldak ilinde 6 ay-15 yaş grubu çocukların %19.6'sının⁽³⁹⁾, İstanbul'da yaşları 3-20 arasında değişen çocukların %61.1'inin⁽⁴⁰⁾, Isparta'da 6-14 yaştaki çocukların %53.5'inin⁽⁴¹⁾ *H. pylori* pozitif olduğu saptanmıştır. Özbek'in Türkiye'nin doğusunda 4-18 yaş aralığındaki çocuklar üzerinde yaptığı çalışmada, %66.3 oranında *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır⁽⁴²⁾.

Çalışmamızda, 1-9 yaş arası çocukların %9.6'sında, 10-19 yaş çocukların ise %19.2'sinde *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Bu oran ülkemizde yapılan çalışmaların birçoğuna göre daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin İstanbul ilinde genel popülasyonda preva-

lansın azalma eğiliminde olması ve buna bağlı olarak yetişkinlerde sıklığın azalması ile birlikte aile içinde çocuklarda da prevalansın azalması olarak düşünülmektedir.

Çalışma sonuçlarımız son yıllarda yapılan prevalans çalışmalarına göre daha düşük bulunmuş olup, prevalansın genel olarak yaşla birlikte artış gösterdiği belirlenmiştir. *H. pylori* sıklığında saptanan azalma sevindirici olmakla birlikte, bu azalmada İstanbul'un metropol şehir olması, gelişmiş ülke şehirleri ile alt yapı ve sanitasyon konularında yarışabilir seviyede olması, sosyoekonomik düzeydeki iyileşme, sağlıklı beslenme ve eğitim seviyelerindeki artışın rolü olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar sosyoekonomik ve sosyokültürel nedenli, iç ve dış kaynaklı göç almaya bağlı, insan hareketlerinin arttığı, megapol bir yerleşim bölgesi olarak İstanbul merkezli Marmara bölgesinde *H. pylori* antijen sıklığı düşük olarak bulunsada *H. pylori*'nin gastroduodenal yakınmaları olan tüm yaş gruplarında önemli bir patojen olduğu ve toplum içinde *H. pylori* izlem stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Etik Kurul Onayı: İ. Ü. Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınmıştır (04.08.2020-83045809-604.01.02).

Çıkar Çatışması: Bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bildirilmemiştir.

Hasta Onamı: Retrospektif bir çalışmadır.

Ethics Committee Approval: İ. Ü. Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Medical Faculty Clinical Research Ethics Committee approval was obtained (04.08.2020-83045809-604.01.02).

Conflict of Interest: Not declared.

Funding: Not declared.

Informed Consent: It is a retrospective study.

KAYNAKLAR

1. Lawson AJ. *Helicobacter*. In: Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press, 2011:900-15.
2. Lehours P, Yilmaz O. Epidemiology of *Helicobacter*

- pylori* infection. *Helicobacter*. 2007;12(Suppl 1):1-3
<https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00541.x>
3. IARC *Helicobacter pylori* Working Group. *Helicobacter pylori* eradication on as a strategy for preventing gastric cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC Working Group Reports No:8); 2014.
 4. Kayali S, Manfredi M, Gaiani F, et al. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. *Acta Biomed*. 2018;89(Suppl 8):72-6.
<https://doi.org/10.23750/abm.v89i8-S.7947>
 5. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antibiotic susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):280-322.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
 6. Shimoyama T. Stool antigen tests for the management of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2013;19(45):8188-91.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i45.8188>
 7. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017;66:6-30.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
 8. Tünger Ö. *Helicobacter pylori* enfeksiyonları. *Infeksiyon Derg*. 2008;22(2):107-15.
 9. Özkan TB. Çocuklarda *H. pylori* enfeksiyonunda seroloji, tanı ve tedavi. *Uludağ Üni. Tıp. Fak. Derg*. 2007;33(2): 81-5.
 10. Göral V, Özdal B, Kaplan A, Şit D, Danış R. Diyarbakır ilinde *Helicobacter pylori* antikor prevalansı. *Akademik Gastroenterol Derg*. 2006;5(1):47-50.
 11. Demir T, Turan M, Tekin A. Kırşehir bölgesindeki dispeptik hastalarda *Helicobacter pylori* antijen prevalansı. *Dicle Tıp Derg*. 2011;38(1):44-8.
 12. Özdemir M, Baykan M. Dispeptik hastalarda *H. pylori* enfeksiyonu tanısında *H. pylori* gaita antijeninin tanı değerlerinin incelenmesi. *Genel Tıp Derg*. 2005;15(2): 65-70.
 13. Gispert JP, Palares JM. Diagnosis of *H. pylori* infection by stool antigen determination: a systemic review. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(10):28-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.04235.x>
 14. Leal YA, Roberto CR, Abraham SJ, Juan RV, Laura LF, Javier T. Utility of stool sample-based tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(6):718-28.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182077d33>
 15. Tkachenko MA, Zhannat NZ, Erman LV, et al. Dramatic changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45(4):428-32.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318064589f>
 16. Chen J, Bu XL, Wang QY, Hu PJ, Chen MH. Decreasing seroprevalance of *Helicobacter pylori* infection during 1993-2003 in Guangzhou, Southern China. *Helicobacter*. 2007;12(2):164-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00487.x>
 17. Schwizer W, Menne D, Schütze K, et al. Impact supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yoghurt on triple for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(9):1669-75.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01335.x>
 18. El-Nasr MS, Elibiary SA, Bastawi MB, et al. Evaluation of a new enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens. *J Egypt Soc Parasitol*. 2003;33(3):905-15.
 19. Aguemon BD, Struelens MJ, Massougbdji A, Ouendo EM. Prevalance and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Beninese populations. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(8):611-7.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01189.x>
 20. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta analysis. *Gastroenterology*. 2017;153(2):420-9.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
 21. Ozaydın N, Turkyılmaz SA, Cali S. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the ¹³C-urea breath test. *BMC Public Health*. 2013; 13:1215.
<https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1215>
 22. Bor S, Kitapcıoğlu G, Kasap E. Prevalance of gastroesophageal reflux disease in a country which a high occurrence of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2017;23(3):525-32.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i3.525>
 23. Salih BA, Abasıyanık MF, Bayyurt N, Sander E. *H. pylori* infection and other risk factors associated with peptic ulcers in Turkish patients: a retrospective study. *World J Gastroenterol*. 2007;13(23):3245-8.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i23.3245>
 24. Büyükbaba-Boral O, Küçük-Anç M, Aktaş G, İşsever H, Anç O. HpSA fecoprevalence in patients suspected to have *Helicobacter pylori* infection in Istanbul, Turkey. *Int J Infect Dis*. 2005;9(1):21-6.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.04.014>
 25. Emre E, Ahışalı E, Dolapçıoğlu C. ve ark. Peptik ülser ve gastrit saptanan hastalarla *Helicobacter pylori* sıklığı. *J Kartal TR*. 2013;24(2):87-92. <https://doi.org/10.5505/jkartaltr.2013.77045>
 26. Umit H, Unsal G, Tezel A, Soylu AR. Helikobakter pilori enfeksiyonu ve benign gastroduodenal hastalıklar, Trakya bölgesi verileri. *Trakya Univ Tıp Fak Derg*.

- 2010;27(4):400-3.
<https://doi.org/10.5174/tutfd.2009.02159.1>
27. Alim A, Ataş AD, Güneş T. Sivas ili merkezinde semptomatik ve asemptomatik yetişkin bireylerde *Helicobacter pylori* seroprevalansı. Cumhuriyet Univ Tıp Derg. 2004; 26:75-80.
28. Ekmen MC, Hepsert AS, Yanık K, Acuner İÇ, Günaydin M, Hökelek M. Gastroduedonal yakınması olan hastalarda Stool Antijen ELISA yöntemiyle *Helicobacter pylori* pozitifliğinin retrospektif olarak değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2007;64(1):6-10.
29. Bayındır Bilman F. Dispeptik yakınmaları olan hastaların dışkı örneklerinde *Helicobacter pylori* antijen pozitifliğinin değerlendirilmesi. Klinik Tıp Bilimleri. 2018;6(2):5-8.
30. Çiftel S, Okçu N, Dursun H, Albayrak Fİ, Usta S. Bölgeimizde *Helicobacter pylori* sıklığı. Güncel Gastroenteroloji. 2016;20/2.157-60.
31. Uyanıkoğlu A, Çoşkun M, Binici DN. ve ark. Endoskopi yapılan hastalarda *Helicobacter pylori* sıklığı. Dicle Med J. 2012;39(29):197-200.
<https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2012.02.0126>
32. Türkölmez S, Cayir D, Aydoğan F, Korkmaz M. The relationship of the *Helicobacter pylori* positively with age, sex, and ABO/rhesus blood groups in patients with gastrointestinal complaints in Turkey. Helicobacter. 2007;12(3):244-50.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00500.x>
33. Bayındır BF, Özdemir M, Baysal B, Güzel KM. Prevalance of *H. pylori* in gastric biopsy specimen in the southeastern region of Turkey. J Infect Dev Ctries. 2016;10(11):1177-82.
<https://doi.org/10.3855/jidc.6690>
34. Erdoğan Durmuş Ş, Balta H, Akalp Özmen S. ve ark. Erzurum ilinde 1-18 yaş çocuklarda histopatolojik olarak *Helicobacter pylori* sıklığı. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Derg. 2016;6(1):73-7.
<https://doi.org/10.5222/buchd.2016.073>
35. Erbey F, Acar MN, Okur M, Güven A. Van Gölü havzasında 1-18 yaş grubu çocuklarda *Helicobacter pylori* sıklığı. Çocuk Enf. Derg. 2010;4(3):93-5.
<https://doi.org/10.5152/ced.2010.12>
36. Sokucu S, Suoglu OD, Turkkan E, Elkabes B, Ozden T, Saner G. *Helicobacter pylori* infection in Turkish children with gastrointestinal symptoms and evaluation of serology. Turk J Pediatr. 2002;44(2):102-8.
37. Muhsen KH, Athamna A, Athamna M, Spungin-Bialik A, Cohen D. Prevalance and risk factors of *Helicobacter pylori* infection among healthy 3- to 5-year-old Israeli Arab Children. Epidemiol. Infect. 2006;134(5):990-6.
<https://doi.org/10.1017/S0950268806006030>
38. Dore MP, Malaty HM, Graham DY, Fanciulli G, Delitala G, Realdi G. Risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection among children in a defined geographic area. Clin Infect Dis. 2002;35(3):240-5.
<https://doi.org/10.1086/341415>
39. Söğüt A, Acun C, Cavuldak Ş, Komşu Z, Tomaç N. Zonguldak ilinde 6 ay-15 yaş grubu çocuklarda *Helicobacter pylori* seropozitifliği ve risk etmenlerinin incelenmesi. Türk Pediatri Arşivi. 2004;39:152-7.
40. Doğan Y, Barış S, Erkan T ve ark. Çocuklarda *Helicobacter pylori* enfeksiyonu: yakınma, endoskopik bulgu, tanı yöntemleri ve tedavi sonrası eradikasyon oranlarının değerlendirilmesi. Turk Ped. Arş. 2007;42(3):98-102.
41. Örmeci AR, Hekimoğlu Ü. Kronik karın ağrılı çocuklarda *Helicobacter pylori* enfeksiyonu: Prevalans, tanı, tedavi ve risk faktörleri. Çocuk Derg. 2003;3(2):144-50.
<https://doi.org/10.5152/tpd.2016.4508>
42. Ozbey G, Dogan Y, Demiroren K, Ozercan IH. Prevalance of *Helicobacter pylori* in children in Eastern Turkey and molecular typing of isolates. Braz J Microbiol. 2015;46(2):505-11.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140234>

Türkiye’de Son On Yılda Saptanan Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Viral Etkenlerin Değerlendirilmesi ve Bibliyometrik Analizi*

Evaluation and a Bibliometric Analysis of Viral Factors in Central Nervous System Infections Detected in the Last Ten Years in Turkey

Berke Gökçılıç*¹, Candan Çiçek**², Aysin Zeytinoğlu**², Ekin Kartal*¹

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye

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

Atf/Cite as: Gökçılıç B, Çiçek C, Zeytinoğlu A, Kartal E. Türkiye’de son on yılda saptanan santral sinir sistemi enfeksiyonlarında viral etkenlerin değerlendirilmesi ve bibliyometrik analizi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):70-85.

Öz

Amaç: Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları, erken tanı/tedavinin kritik derecede önemli olduğu, ciddi sekellere neden olabilen bir klinik tablo olup virüsler, saptanan başlıca etkenler arasındadır. Santral sinir sistemi enfeksiyonlarının belirlenmesinde nükleik asit testleri altın standart olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, son on yılda Türkiye’de beyin-omurilik sıvısı (BOS) örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle viral etkenlerin araştırıldığı çalışmalar değerlendirilmiştir ve bibliyometrik analizi yapılmıştır.

Yöntem: 1.1.2010 ve 1.1.2020 tarihleri arasında iki ulusal (Ulakbim, Dergipark) ve dört uluslararası (PubMed, Google Scholar, Scopus, Web of Science) veri tabanına ek olarak iki ulusal ve iki uluslararası kongre bildirileri taranmıştır.

Bulgular: Çalışmaya toplam 33 çalışmadan 12.669 BOS örneği dâhil edilmiştir. En fazla yayın yapan dergi dört çalışmayla Mikrobiyoloji Bülteni’dir. En çok BOS örneği İzmir’de toplanmış (n=5566), en fazla yayını dörder çalışmayla Ankara, Ege ve Hacettepe üniversiteleri yapmıştır. Yapılan çalışma sayısı yıllarla artış eğilimindedir. Çalışmalarda saptanan başlıca viral etkenlerin yüzdelerin aritmetik ortalamaları enterovirüs, herpes simpleks virüs, insan herpesvirüs 6 ve 7, adenovirüs, Epstein-Barr virüs, sitomegalovirüs, varisella zoster virüs, insan parechovirüs ve parvovirüs B19 için sırasıyla %2.64, %2.58, %1.90, %0.41, %1.71, %1.57, %1.24, %0.83, %0.47 ve %0.05 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Yapılan bibliyometrik analiz ile Türkiye’deki viral SSS enfeksiyonları sıklığına dair yapılan araştırmaların son on yıldaki durumu incelenmiş ve saptanan etkenler değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler konunun bilimsel literatürdeki yerinin tanımlanmasında ve moleküler yöntemlerin kullanımının arttığı, klinikle eşgüdümü, yeni ve daha güvenilir epidemiyolojik verilerle karşılaştırılmasında yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Viral santral sinir sistemi enfeksiyonu, polimeraz zincir reaksiyonu, bibliyometri

ABSTRACT

Objective: Central nervous system (CNS) infections are clinical entities that can lead to serious sequelae in which early diagnosis/treatment is critical and viruses are among the main causative factors detected. Nucleic acid tests are used as the gold standard in determining CNS infections. In this study, studies from Turkey investigating viral agents from cerebrospinal fluid (CSF) samples by polymerase chain reaction method in the last decade have been evaluated and a bibliometric analysis was conducted.

Method: Two national (Ulakbim, Dergipark) and four international (PubMed, Google Scholar, Scopus, Web of Science) databases as well as two national and two international congress abstracts published between 1.1.2010-1.1.2020 were searched.

Results: A total of 12669 CSF samples from 33 studies were included in the analysis. The highest number of publications was identified in Mikrobiyoloji Bülteni (n=4). The highest number of CSF samples was collected in Izmir (n=5566). Ankara, Ege, and Hacettepe Universities conducted the highest number of studies (4 each). The number of studies tends to increase over the years. The arithmetic means of the percentages calculated for enterovirus, herpes simplex virus, human herpesvirus 6, human herpesvirus 7, adenovirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, varicella-zoster virus, human parechovirus, and parvovirus B19 were 2.64%, 2.58%, 1.90%, 0.41%, 1.71%, 1.57%, 1.24%, 0.83%, 0.47%, and 0.05%, respectively.

Conclusion: The bibliometric analysis performed, analyzed the status of research studies on the incidence rates of viral CNS infections in Turkey, and the viral factors detected were evaluated. The data obtained will be useful in defining the place of the subject in scientific literature and in comparing with the new and more reliable epidemiological data being in coordination with clinical process where the molecular techniques were used increasingly.

Keywords: Viral central nervous system infection, polymerase chain reaction, bibliometrics

Alındığı tarih / Received:

18.07.2020 / 18.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:

03.12.2020 / 03.December.2020

Yayın tarihi / Publication date:

31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

B. Gökçılıç 0000-0001-7011-6015

C. Çiçek 0000-0002-3486-8305

A. Zeytinoğlu 0000-0003-4174-9539

E. Kartal 0000-0002-5399-637X

berkegokkilic@gmail.com

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

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

GİRİŞ

Santral sinir sistemi enflamasyonunun en sık sebebi enfeksiyonlardır ve bu enfeksiyonların başlıca etkenleri arasında virüsler bulunmaktadır⁽¹⁾. Santral sinir sistemi enfeksiyonlarından özellikle ensefalit olgularının büyük bir kısmının etiyojisi belirlenememektedir⁽²⁻⁶⁾. Viral menenjit olguları genellikle selim seyrederken, ensefalit ciddi komplikasyonları olabilen, erken tanı ve tedavisi sağlanmadığında yüksek mortalite oranları ve sekellerle seyreden bir tablodur⁽⁷⁾. Bu nedenle SSS enfeksiyonlarına yönelik gelişmiş epidemiyolojik verilerin oluşturulması hastalığa klinik yaklaşımın da gelişmesi ve toplum sağlığının korunması açısından önemlidir.

Santral sinir sistemi enfeksiyonlarının etiyojisinin belirlenmesinde nükleik asit testleri altın standarttır⁽⁸⁾. Son yıllarda moleküler yöntemlerin ve panellerin kullanımının yaygınlaşmasıyla bu etkenlerin saptanması kısa sürede daha kolay bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu nedenle polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi yöntemler, erken tanı ve tedavinin özellikle önem arz ettiği bu hastalık grubunda yarar sağlamaktadır.

Ülkemizde SSS enfeksiyonlarının insidansına ilişkin epidemiyolojik veriler kısıtlıdır. Bu çalışmada da son on yılda Türkiye’de SSS enfeksiyonlarına dair BOS örneklerinden PZR ile viral etkenlerin araştırıldığı çalışmalar sistematik bir şekilde taranmış, bibliyometrik analizi yapılmış ve saptanan etkenlerin sıklıkları incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaların Dışlama/Dâhil Edilme Kriterleri: Derlemeye dâhil edilen çalışmaların hepsinin konuyla ilgili gerekli etik kurul izinleri vardır.

1 Ocak 2010 itibarıyla 1 Ocak 2020 tarihine kadarki süreçte yayınlanmış, BOS örneklerinden PZR ile viral etkenlerin araştırıldığı prospektif ve retrospektif kesitsel çalışmalar dikkate alınarak bu amaçla

Ulakbim, Dergipark, PubMed, Google Scholar, Scopus, Web of Science (WoS) veritabanları yanı sıra SCI endeksli Türk dergilerinden Mikrobiyoloji Bülteni, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi ve Klimik Dergisi taranmıştır. Ulakbim, Dergipark ve Google Scholar’da ‘ensefalit’, ‘menenjit’, ‘santral/merkezi sinir sistemi enfeksiyonu’ anahtar kelimeleriyle arama yapılmış; PubMed, Web of Science ve Scopus’ta ise ‘encephalitis’, ‘meningitis’ ve ‘central nervous system infection’ anahtar kelimeleri kullanılmıştır. PubMed’de ayrıca ‘viral’ ve ‘Turkey’ anahtar kelimeleri eklenmiştir. Scopus taramasında ‘Region/Territory’ kısmında Türkiye işaretlenmiştir. Yine aynı tarihler arasındaki Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (TMC), Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD), ‘European Society of Clinical Virology’ (ESCV) ve ‘European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases’ (ECCMID) kongre bildirileri taranmıştır. Aynı çalışmanın yayını ve kongre bildirisi saptandığında yayın referans alınmıştır. Birbiriyle çakışan verilerin yayınlandığı çalışmalarla karşılaştırıldığında zaman aralığı daha geniş olan dikkate alınmıştır. Bir hastadan birden fazla BOS örneği alınan çalışmalarda, hasta sayısı referans alınmıştır. Hastadan alınan herhangi bir BOS örneğinde pozitiflik çıktığı takdirde, hasta etken pozitif kabul edilmiştir. Gerekli durumlarda ilgili yazarla iletişime geçilmiş ve gerekli verilere bu şekilde ulaşılmıştır (Betül Günaydın⁽⁹⁾, Kullanılan PZR kiti ve araştırılan etkenler hususunda, e-mail ile iletişim, 28 Ocak 2020, 11:59; Bilge Gültepe⁽¹⁰⁾, BOS örneklerinin kabul edildiği merkezler hususunda, e-mail ile iletişim, 2 Şubat 2020, 23:24; Hasip Kahraman⁽¹¹⁾, Manisa Celal Bayar Üniversitesi’nden kabul edilen BOS örneği sayısı hususunda, e-mail ile iletişim, 21 Şubat 2020, 12:17.).

Çalışmalarda menenjit, aseptik/viral menenjit, ensefalit, SSS enfeksiyonu, viral SSS enfeksiyonu ve aseptik meningoensefalit klinik ön tanı olgulardan alınan BOS örneklerinden araştırılan viral etkenler derlenmiştir. Çeşitli nörolojik hastalık tanı/ön tanısı alan gruplarda yahut yalnızca belirli bir hasta ya da yaş grubunda yapılan çalışmalar ise derlemeye alınmamıştır.

Bu çalışmada, 2010 ve sonrasında yayınlanmasına rağmen 2010 öncesi verileri sunan çalışmalar dâhil edilmemiştir. Aynı şekilde 2010 ve sonrasında yayınlanıp; hem 2010 öncesi, hem 2010 ve sonrası hakkında veri sunan çalışmalar dâhil edilmiştir.

Çalışmaların Değerlendirilmesi: Çalışmalar; yapıldığı bölge, kuruluş, atıf sayısı, yayınlanan akademik dergiler ve bu dergilerin etki faktörleri (EF, İngilizce: impact factor) açısından değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, yapılan çalışmaların ve toplanan BOS örneklerinin yıllara ve etkenlere göre dağılımı da incelenmiştir. Atıf sayısı Google Scholar veri tabanına göre değerlendirilmiştir.

Çalışmalardaki demografik veriler- kadın/erkek oranı, yaş dağılımı/aralığı- etkenlere göre ayrılmadan, toplu olarak değerlendirilmiştir. Hastaların PZR pozitiflik durumları ve PZR pozitif hasta gruplarının demografik özellikleri ise etkenlere ayrılarak değerlendirilmiştir.

Çoklu etkenlerin araştırıldığı çalışmalarda toplam örneklem içinden belirli bir etkenin yüzde oranında pozitifliği hesaplanmıştır. Araştırılan etkenin pozitiflik oranı yüzde olarak belirtilmek suretiyle aynı etkenin araştırıldığı her çalışmada, o etkenin pozitiflik yüzdeleri hesaplanmış ve çalışmalardaki yüzde oranlarının aritmetik ortalaması alınmıştır. Araştırılan tüm etkenler için bu işlem yapılmış ve elde edilen veriler birbiriyle karşılaştırılmıştır. Koenfeksiyon durumları hesaplamalardan ayrı tutulmuş, ayrıca belirtilmiştir. Bu nedenle hesaplanan oranlar yalnızca tek etkenin saptandığı olgulardan oluşmaktadır.

Herpes simpleks virüsler (HSV) değerlendirilirken; HSV1, HSV2 ve HSV (belirtilmemiş) olarak üç grup oluşturulmuştur. Bu sayede HSV1 ve 2 ayrımı yapılmayan çalışmalar da değerlendirmeye alınabilmiştir. Herhangi bir etkenin saptanamadığı ve diğer etkenlerin ekarte edildiği örneklerle yapılan çalışmaları diğerlerinden ayrı olarak kendi içlerinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Dışlama ve dâhil edilme ölçütlerine göre toplamda 154 araştırmacının yazar olarak yer aldığı on iki yayın⁽¹⁰⁻²¹⁾, yirmi kongre bildirisi^(9,22-40) ve bir tez⁽⁴¹⁾ değerlendirilmiştir. Bu kapsamda toplam 12669 BOS örneği değerlendirmeye alınmıştır. Bu çalışmaların içinden üç yayın⁽¹⁹⁻²¹⁾, bir kongre bildirisi⁽⁴⁰⁾ ve tez⁽⁴¹⁾ çalışmasında herhangi bir etkenin saptanamadığı ve diğer etkenlerin ekarte edildiği BOS örneklerinde ek birtakım spesifik ajanlar çalışılmış olup bu çalışmalardaki BOS sayısı, toplamın 472'sini (472/12669) oluşturmaktadır. Derlemeye alınan BOS örneklerinin 6533'ü (%51.57) yayın haline gelmemiş bildiri özetlerinden oluşmaktadır. Araştırılan viral etkenler herpes simpleks virüs 1-2 (HSV1-2), enterovirüs (EV), adenovirüs (AdV), sitomegalovirüs (CMV), Epstein-Barr virüs (EBV), insan herpes virüs 6-7-8 (HHV 6-7-8), insan parechovirüs (HPEV), varisella zoster virüs (VZV), parvovirüs B19, kabakulak, kızamık, bocavirüs (HBoV); diğer etkenlerin ekarte edildiği örneklerde ise Batı Nil virüsü (BNV), Toskanavirüs (TOSV), Tick-Borne virüs (TBV - kene kaynaklı virüs), lenfaositik koryomenenjit virüs (LCMV) ve bufavirüs'tür (BuV).

Çalışmalarda viral etkenlerin saptanması için kullanılan PZR kitleri, kullanılan hazır sistemlerin alt saptama limitleri (LOD - "limit of detection") ve aynı zamanda in vitro tanı (IVD - "in vitro diagnostic") veya yalnızca araştırma amaçlı (RUO - "research-use only") kullanım bilgileri Tablo 1'de belirtilmiştir.

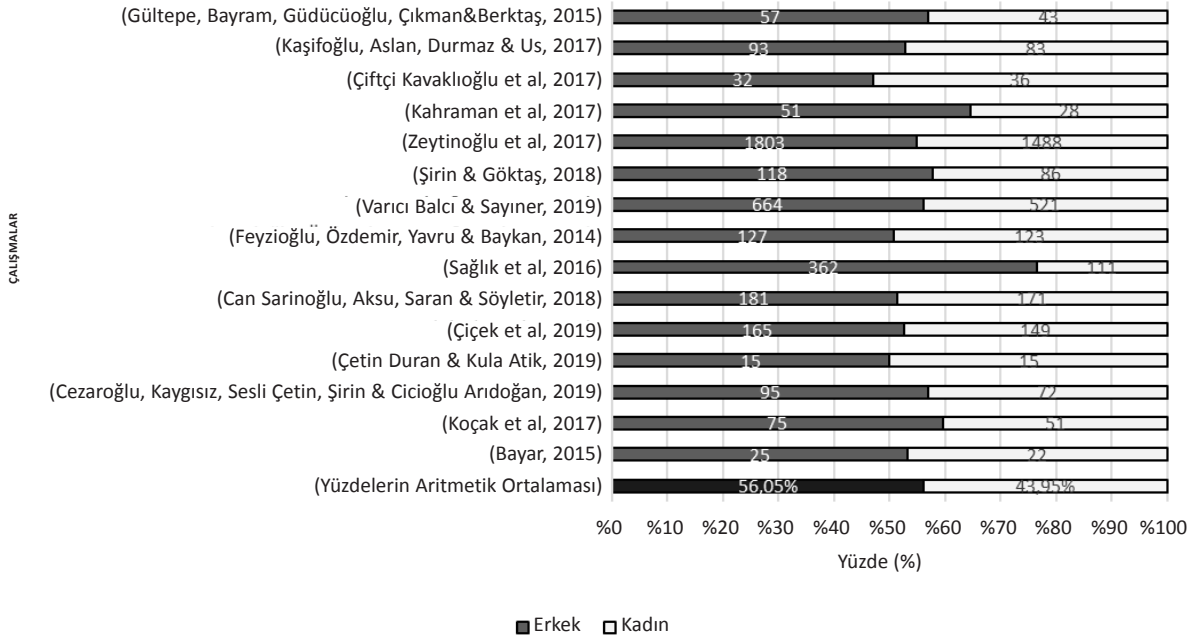
Çalışmalardan toplamda 6862 (%54.16) hastanın cinsiyetine, 5667 (%44.81) hastanın da yaş grubuna ait bilgiye ulaşılabilmektedir (Şekil 1, Şekil 2). Konuyla ilgili 2010-11 yıllarında bir çalışma bulunmazken 2019 bir yayın ve sekiz bildiriyle en çok çalışmanın yapıldığı yıldır. Çalışma sayısının ve BOS miktarlarının yıllara göre dağılımı Şekil 3'te özetlenmiştir. Çalışmaların etkenlere göre dağılımları ise BOS sayılarıyla birlikte Şekil 4'te gösterilmiştir. Bu çalışmalarda BOS örneklerinin toplandığı zaman aralıkları ve miktarı Şekil 5'te görülmektedir.

Tablo 1. Derlemeye alınan çalışmalarda kullanılan PZR kitleri, bu kitlerin araştırdığı etkenler ve alt saptama limitleri.

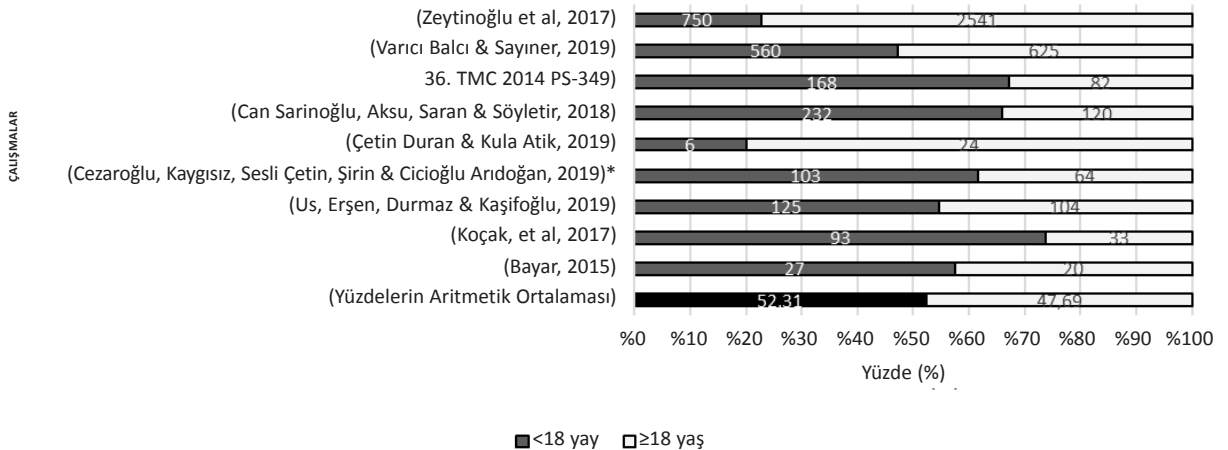
PZR Kiti (Marka)	Etken	Alt Saptama Limiti (LOD)
Abbott Molecular, ABD (IVD) ⁽¹⁵⁾	CMV	31.20 IU/ml
Anatolia Geneworks, Türkiye (IVD) ⁽³⁵⁾	EV, HPeV, HSV1-2, VZV	Sırasıyla 39, 500, 11, 7 ve 9 kopya/reaksiyon
BioGX, ABD (IVD) ⁽³⁷⁾	HSV1-2, VZV	Sırasıyla 23, 18 ve 15 kopya/reaksiyon
bioMérieux/Argene, Fransa (IVD) ^(25,27)	EV	Koksaki virüs A13: 0.01 TCID ₅₀ /ml, Poliovirüs 1: 10 TCID ₅₀ /ml
	HPeV	HPeV1: 0.62 TCID ₅₀ /ml, HPeV2: 9.92 TCID ₅₀ /ml
bioMérieux/Filmarray, Fransa (IVD) ^(30,33,34,39)	CMV	100 TCID ₅₀ /ml (4300 kopya/ml)
	EV	Koksaki virüs A6 ve EV70: 50 TCID ₅₀ /ml Koksaki virüs A9 ve A17: 5 TCID ₅₀ /ml
	HHV6	10.000 kopya/ml
	HPeV,	500 TCID ₅₀ /ml
	HSV1	250 TCID ₅₀ /ml (1510 kopya/ml)
	HSV2	50 TCID ₅₀ /ml (1290 kopya/ml)
	VZV	0.10 TCID ₅₀ /ml (1660 kopya/ml)
Cepheid GeneXpert, ABD (IVD) ^(15,18)	EV	Koksaki virüs A6-A9-A17, EV70 ve poliovirüs 1 için sırasıyla 33, 80, 1, 1 ve 13 TCID ₅₀ /ml
Fast Track Diagnostics, Lüksemburg (IVD) ^(32,36)	EV, HBoV, HPeV, HSV1-2, VZV	Sırasıyla 7.600, 16.000, 42.000, 17.000, 28.000 ve 3.600 kopya/ml
Fast Track Diagnostics, Neuro 9, Lüksemburg (RUO) ^(13,29,33,38)	AdV, CMV, EBV, EV, HHV6-7, HPeV, HSV1-2, parvovirüs B19, VZV	-*
İontek, Türkiye (IVD) ⁽¹⁵⁾	CMV	48 kopya/ml
	EBV	50 IU/ml
PathoFinder, Hollanda (IVD) ^(17,26)	CMV	11 IU/reaksiyon
	EV	Koksaki virüs B1: 33/105** kopya/reaksiyon
	HHV6, HPeV, HSV1	Her bir etken için 3 kopya/reaksiyon
	HHV7-8, HSV2, VZV	Her bir etken için 11 kopya/reaksiyon
	EBV, kabakulak, kızamık	Sırasıyla 105, 7 ve 6 kopya/reaksiyon
Primerdesign Genesig, Birleşik Krallık (RUO) ⁽⁴¹⁾	BNV	<100 kopya/reaksiyon
Progenie, İspanya (IVD) ⁽²⁷⁾	EV	1 kopya/μl
Qiagen, Almanya (IVD) ^(12,15,16,18,22)	CMV, EBV, HSV1-2	Sırasıyla 42,5, 157, 57,3 ve 65,7 kopya/ml
Sacace, İtalya (IVD) ^(10,15)	EV, HHV6	Sırasıyla 1.000 ve 200 kopya/ml
	HSV1-2	Her bir etken için 500 kopya/ml
Seegene, Güney Kore (RUO) ^(11,15,24,32)	HBoV	Seeplex RV15 ACE Detection Kit: 100 kopya/reaksiyon (100 kopya/ μl) Anyplex II RV16 Detection Kit: 50 kopya/reaksiyon
	CMV, EBV, EV, HHV6, HSV1-2, VZV	Her bir etken için 100 kopya/reaksiyon
TIB Molbiol, Almanya (IVD-RUO) ^{*** (15,19,23)}	AdV, CMV, EBV, EV, HHV6-7-8, HPeV, HSV1-2, VZV	Her bir etken için 10 kopya/reaksiyon
<i>in-house</i> gerçek zamanlı PZR ^(18-20,31)	BNV, BuV, CMV, EV, HPeV, HSV1-2, LCMV, TBEV, TOSV, VZV	-

*: Bahsi geçen kitin kullanım kılavuzunda LOD bilgileri bulunmamaktadır.

** : LightCycler®480 ile 33, Rotor-Gene®Q ile 105 kopya/reaksiyon saptanmıştır. ***: EV ve HPeV çalışılan kitler IVD olup diğerleri RUO'dur.



Şekil 1. Derlemeye alınan çalışmalardaki kadın-erkek oranları. Toplamda 15 çalışmada hastaların cinsiyetine dair veriye ulaşılmıştır. En alttaki satır, bu oranların aritmetik ortalamasını göstermektedir.

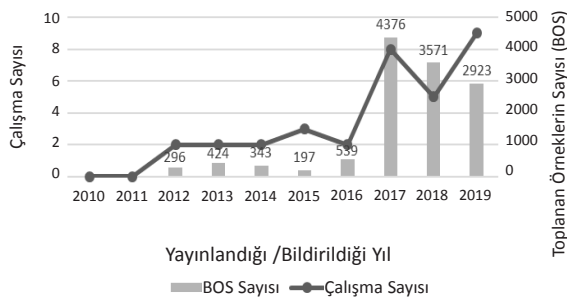


Şekil 2. Derlemeye alınan çalışmalardaki hastaların yaş gruplarına göre dağılımı. Toplamda 9 çalışmada hastaların yaş gruplarına dair veriye ulaşılmıştır. En alttaki satır, bu oranların aritmetik ortalamasını göstermektedir. *Çalışmada kesme noktası 16 yaş olarak alınmıştır.

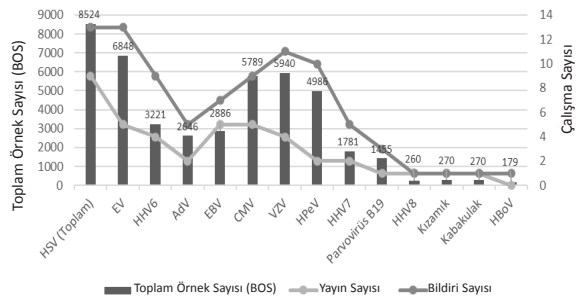
Toplanan BOS örneklerinin Türkiye geneline dağılımı değerlendirildiğinde (Şekil 6), örneklerin beşinin Marmara, ikisinin Ege, üçünün Akdeniz, üçünün İç Anadolu, birinin Doğu Anadolu Bölgesi olmak üzere toplamda 14 ilden toplandığı görülmektedir. Bu illerde çalışılan BOS örneklerinin sayıları; İzmir'den 5566, Ankara'dan 3109, İstanbul'dan 1125, Antalya'dan 897, Konya'dan 848, Eskişehir'den 405, Isparta'dan 371, Sakarya'dan 110, Tekirdağ'dan 56, Kocaeli'den

52, Mersin'den 50, Elazığ'dan 47, Balıkesir'den 30 ve Manisa'dan 3 adettir.

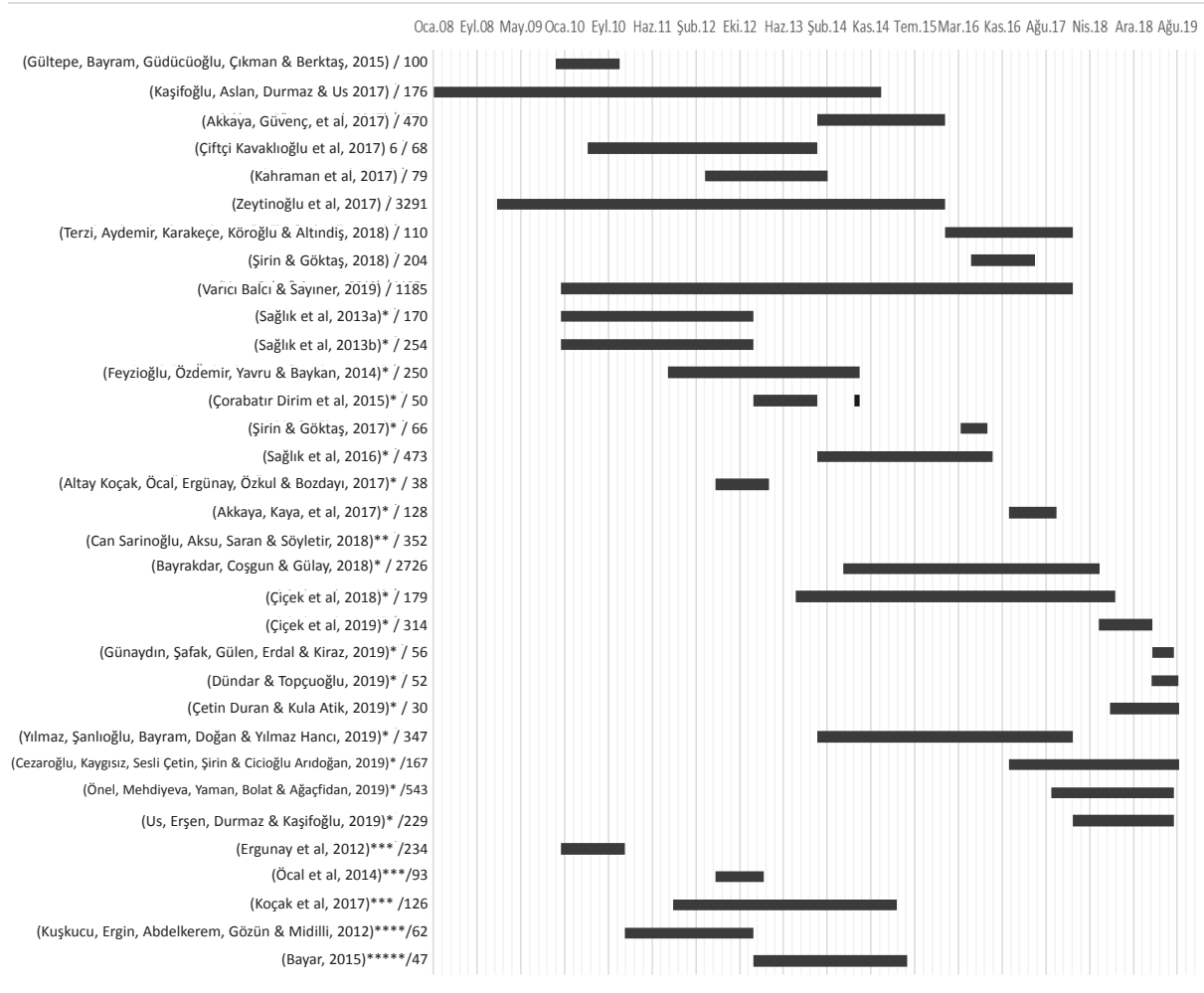
Akademik Dergilerin ve Çalışma Yapan Merkezlerin Dağılımı: Dâhil edilen çalışmaların yayınlandığı dokuz akademik dergi tespit edilmiştir. Bu çalışmaların dördü Mikrobiyoloji Bülteni'nde (2019 EF: 0.23) yayınlanmıştır. Kalan sekiz çalışmanın her biri ayrı akademik dergide yayın olmuştur. Bu dergilerin üçü



Şekil 3. Derlemeye alınan çalışmaların yayınlama/bildirilme durumlarının ve BOS miktarlarının yıllara göre dağılımı.



Şekil 4. Toplanan BOS örneği sayısının etkenlere ve çalışma sayılarına göre dağılımı.



Şekil 5. BOS örneklerinin çalışmalarda toplandıkları zaman aralıkları.

İsim kısmında '/' sonrasında bulunan değer, o çalışmaya alınmış toplam BOS sayısını göstermektedir.

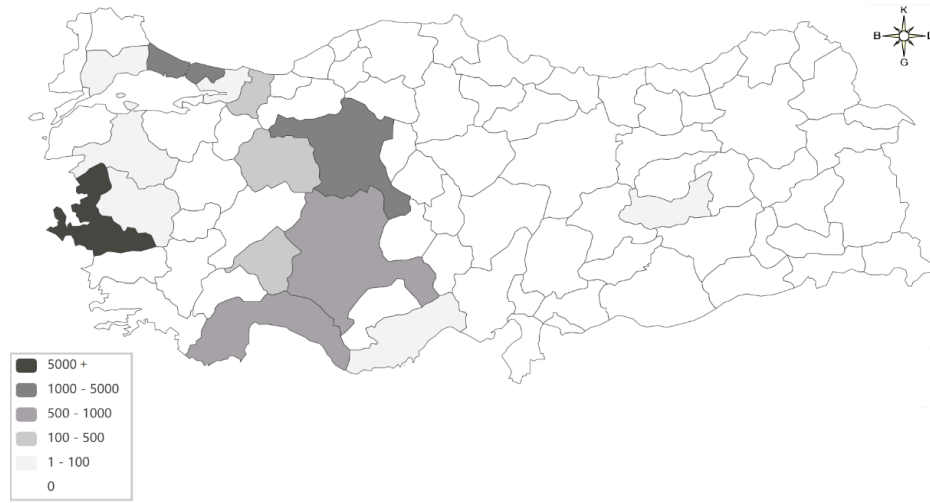
*: Kongre Bildirisi

** : Çalışmada BOS örneklerinin toplandığı zaman aralığına dair veri bulunmamaktadır.

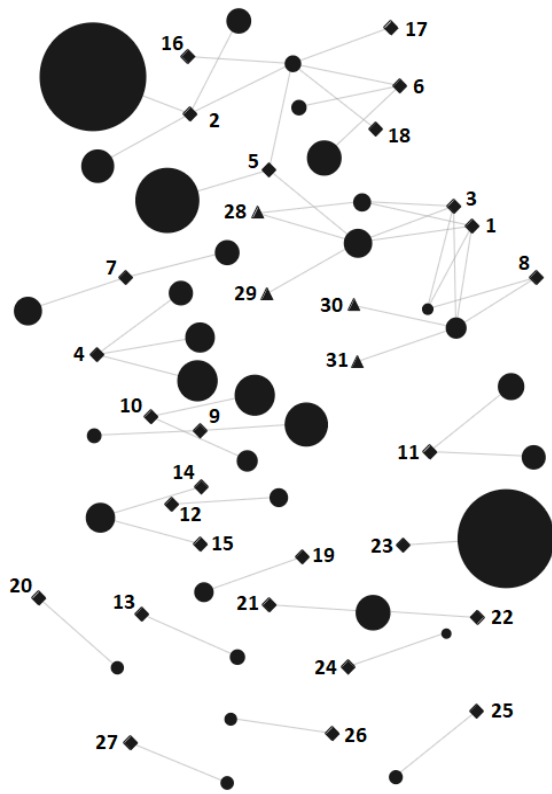
***: Diğer etkenler ekarte edildikten sonra BOS örneklerinin çalışmaya alındığı yayın.

****: Diğer etkenler ekarte edildikten sonra BOS örneklerinin çalışmaya alındığı kongre bildirisi.

*****: Diğer etkenler ekarte edildikten sonra BOS örneklerinin çalışmaya alındığı tez.



Şekil 6. Derlemeye alınan çalışmalardaki BOS örneklerinin illere göre dağılımını gösteren Türkiye haritası.



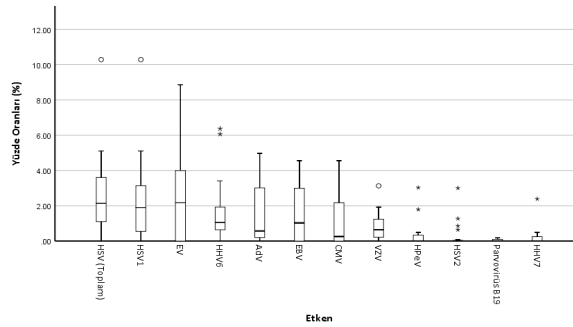
“Science Citation Index” (SCI) kapsamında değildir. Söz konusu dergiler; Journal of Infection (2019 EF: 1.98), Zoonoses and Public Health (2019 EF: 0.96), Clinical Laboratory (2019 EF: 0.35), Acta Medica Mediterranea (2019 EF: 0.13), Nöropsikiyatri Arşivi (2019 EF: 0.32), SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi, Osmangazi Tıp Dergisi ve Abant Tıp Dergisi’dir.

Diğer yirmi kongre bildirisi ve bir tez ise herhangi bir dergide yayınlanmamış olup kongre bildirilerinin on biri KLİMUD, altısı TMC ve üçü ESCV kongrelerinde sunulmuştur.

Değerlendirilen yayınların iki tanesi^(16,21) hiç atıf almamışken en çok atıf alan yayın 32 atıfla Ergünay ve ark.’nın⁽¹⁹⁾ çalışmasıdır. Diğer çalışmaların aldıkları atıf sayıları ise büyükten küçüğe şu şekildedir: 23⁽²⁰⁾, 13⁽¹³⁾, 6⁽¹¹⁾, 4⁽¹⁰⁾, 3⁽¹⁴⁾, 2^(12,15) ve 1^(17,18).

Üçü uluslararası olmak üzere toplam yedi çalışma çok merkezlidir. Bu çalışmaların büyük çoğunluğunun

Şekil 7. Çalışmalar ile çalışmayı yapan merkezlerin ilişkisini gösteren ağaç grafiği. Grafikte yuvarlaklar çalışmayı, baklavalalar çalışmayı yapan merkezleri, üçgenler ise uluslararası kuruluşları temsil etmektedir. Yuvarlakların büyüklüğü çalışmada değerlendirilen BOS miktarıyla doğru orantılıdır. Söz konusu grafik Zingchart internet sitesinde hazırlanmıştır (<https://www.zingchart.com/docs/chart-types/tree-module>). Numaralandırılmış merkezler: 1- Ankara Üniversitesi, 2- Ege Üniversitesi, 3-Hacettepe Üniversitesi, 4- Akdeniz Üniversitesi, 5- Dokuz Eylül Üniversitesi, 6- Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 7- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 8- Gazi Üniversitesi, 9- İstanbul Üniversitesi, 10- Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 11- Süleyman Demirel Üniversitesi, 12- Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 13- Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 14- Selçuk Üniversitesi, 15- Necmettin Erbakan Üniversitesi, 16- Manisa Celal Bayar Üniversitesi, 17- Bozuyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 18- Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 19- Sakarya Üniversitesi, 20- Mersin Üniversitesi, 21- Marmara Üniversitesi, 22- Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 23- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 24- Balıkesir Üniversitesi, 25- Tekirdağ Üniversitesi, 26- Fırat Üniversitesi, 27- Kocaeli Üniversitesi, 28- Robert Koch Enstitüsü, 29- Aix-Marseilles Üniversitesi, 30- Oita Üniversitesi, 31- Malezya-Sabah Üniversitesi.



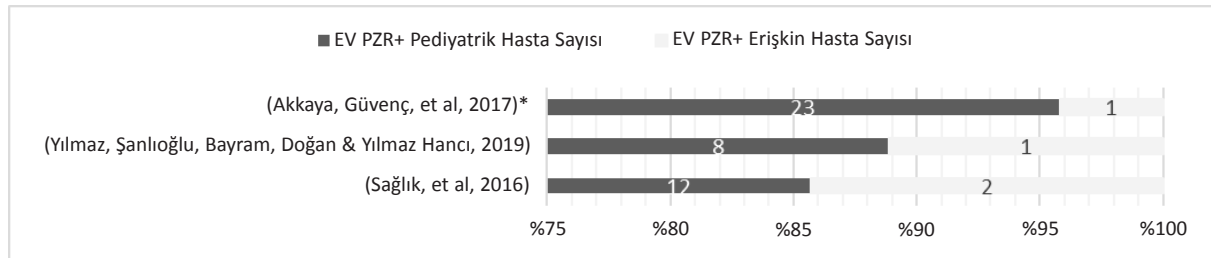
Şekil 8. Araştırılan etkenlerin pozitifliklerinin yüzdesel oranlarının dağılımını gösteren kutu.

bölgesel işbirliği düzeyinde kaldığı görülmektedir. En fazla çalışma yapan merkezler ise dörder çalışmayla Ankara Üniversitesi, Ege Üniversitesi, Hacettepe Üniversitesi ve ardından üçer çalışmayla Akdeniz Üniversitesi, Dokuz Eylül Üniversitesi ve Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi’dir. Yapılan çalışmalar ve çalışmayı yapan merkezlerin ilişkisi Şekil 7’de gösterilmiştir.

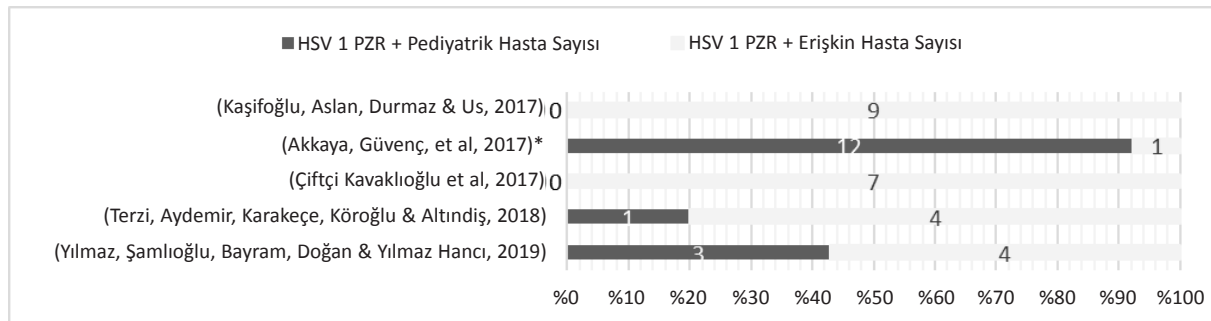
Saptanan Etkenlerin Değerlendirilmesi: Çalışmalardaki etkenlerin PZR pozitiflik yüzdelerinin dağılımı ise Şekil 8’de görülmektedir.

EV: Çalışmalarda^(9,11,13,15,17,18,25-29,31,33-36,38,39) EV PZR pozitif olguların yüzdesel oranlarının aritmetik ortalaması %2.64 olarak hesaplanmıştır ve EV bu bağlamda hesaplanan en yüksek yüzde ortalamasına sahip etkidir. EV PZR pozitif hastaların yaş grubu değerlendirildiğinde, pediyatrik yaş grubunun hastaların çoğunluğunu oluşturduğu görülmektedir (Şekil 9). Pediyatrik-erişkin ayrımının yapıldığı çalışmalardaki PZR pozitif pediyatrik hastaların yüzdesel oranlarının ortanca değeri ise %88.89’dur.

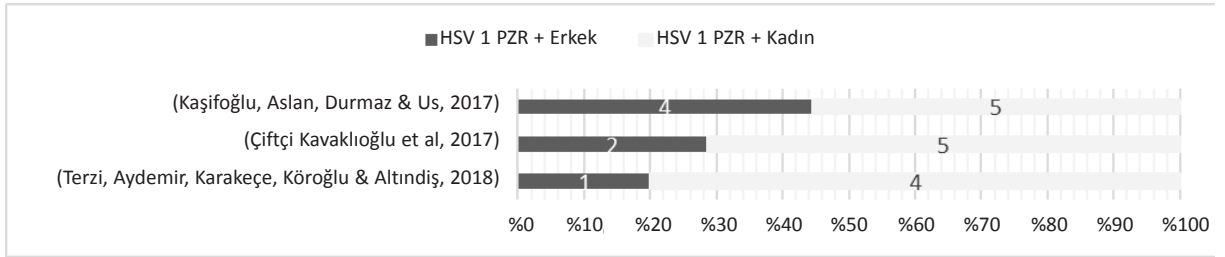
HSV 1-2: Herpes simpleks için derlemeye alınan çalışmaların ikisinde^(31,39) HSV1 ve HSV2 ayrımı belirtilmemiş olup bu iki çalışmada toplam 2965 BOS örneği değerlendirilmiştir. Kalan çalışmalarda^(9-18,24,26,28,29,33-38) toplam 5559 BOS örneği hem HSV1 hem de HSV2 yönünden araştırılıp pozitiflikleri ayrı ayrı bildirilmiştir. Herpes simpleks virüs 1, 2 ve toplam HSV DNA PZR pozitifliklerinin yüzdesel oranlarının aritmetik ortalamaları değerlendirildiğinde toplam HSV pozitifliğinin %2,58 ile en yüksek ikinci ortalama yüzde değerine sahip olduğu görülmektedir. Herpes simpleks virüs 1 ve 2 ayrı değerlendirildiği takdirde ise, sırasıyla %2.31’lik ve %0.29’luk ortalama yüzde değerlere sahip olduğu



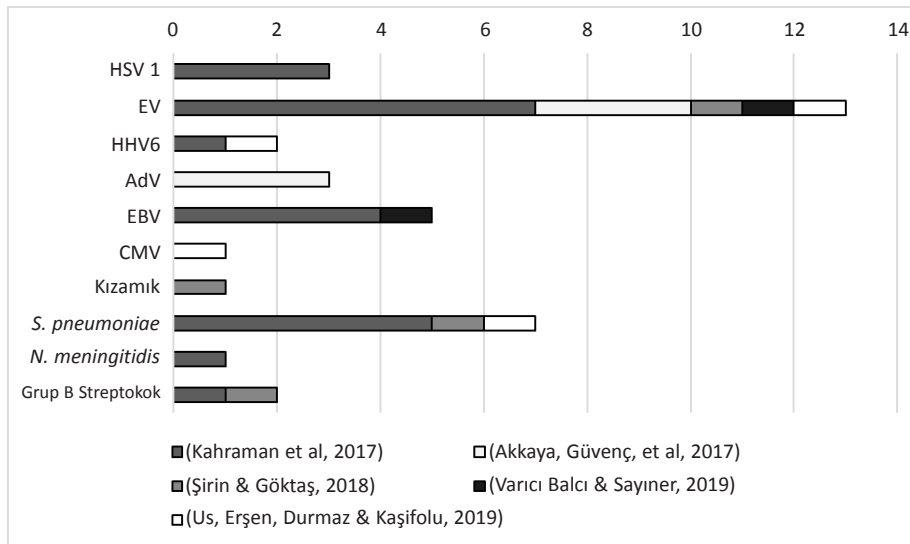
Şekil 9. EV PZR+hastaların yaş dağılımı. *: Çalışmada kesme yaşı 16 olarak alınmıştır.



Şekil 10. HSV1 PZR+hastaların yaş dağılımı. *: kesme yaşı 16



Şekil 11. HSV1 PZR+hastaların cinsiyet dağılımı.



Şekil 12. Çalışmalarda saptanan koenfeksiyonlardan izole edilen etkenler.

görülmektedir. Çalışmaların üçünde HSV 1 PZR pozitif saptanan hastaların cinsiyet dağılımına, beşinde de yaş grubuna ait veri bulunmaktadır (Şekil 10, Şekil 11). Bu çalışmalarda HSV 1 PZR pozitif kadınların yüzdesel oranlarının ortalanca değerinin %71.43, HSV 1 PZR pozitif erkeklerin yüzdesel oranlarının ortalanca değerinin de %80 olduğu görülmektedir.

Diğer Etkenler: Çalışmalarda HHV6^(9,11,13,15,17,24,26,29,30,33,34,38,39) ve HHV7^(9,13,17,26,29,33,38) PZR pozitif hastaların yüzdesel oranlarının aritmetik ortalaması sırasıyla %1.90 ve %0.41 olarak hesaplanmıştır. Çalışmaların ikisinde^(30,33) etkisiz (bystander) HHV6 pozitiflikleri bildirilmiştir; bu iki çalışmadan birinde on iki hastada HHV6 PZR pozitif saptansa da yalnızca yedisine tanı konmuş, diğer çalışmada ise iki hastada PZR pozitif saptanmakla birlikte klinik olarak desteklenmemiştir. Bu iki çalışmada da HHV8 saptanmamıştır.

Adenovirüs^(9,13,18,23,29,33,38), EBV^(9,11,13,15,17,18,22,24,26,29,33,38), CMV^(9,11,13,15,17,18,24,26,29,31,33,34,38,39), VZV^(9,11,13,15,18,24,26,29,31,33-38), HPeV^(9,13,17,25,26,29,31,33-36,38) ve parvovirüs B19^(13,29,33,38) için PZR pozitifliklerinin yüzdesel oranlarının aritmetik ortalaması sırasıyla %1.71, %1.57, %1.24, %0.83, %0.47, %0.05 olarak hesaplanmıştır.

Kızamık ve kabakulak ise iki aynı çalışmada^(17,26) araştırılmış, kabakulak için etken saptanmamakla birlikte bir BOS örneğinde kızamık PZR pozitif saptanmıştır. Bir çalışmada⁽³²⁾ HBoV araştırılmış ve altı hastada pozitiflik saptanmıştır. Fakat yalnızca iki hastada merkezi sinir sistemi enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilmiş, diğer pozitifliklerin etkisiz 'bystander' olduğu bildirilmiştir.

Koenfeksiyonlar: Dördü yayınlanmış olan toplam beş çalışmada koenfeksiyon saptanmıştır (Şekil 12). Kahraman ve ark.'nın⁽¹¹⁾ çalışmasında 11 hastada

(%13.92) koenfeksiyon saptanmış, bu hastaların sekizinde bakteri + virüs ve üçünde virüs + virüs koenfeksiyonu olduğu görülmüştür. Akkaya ve ark.’nın⁽¹³⁾ çalışmasında üç hastada (3/470, %0.64) koenfeksiyon saptanmış olup hepsi virüs + virüs koenfeksiyonudur. Şirin ve Göktaş’ın⁽¹⁷⁾ çalışmasında iki hastada (2/204, %0.98) koenfeksiyon saptanmıştır (bir virüs + virüs, bir bakteri + virüs). Varıcı Balcı ve Sayiner’in⁽¹⁸⁾ çalışmasında bir hastada (1/1185, %0.08) virüs + virüs koenfeksiyonu saptanmıştır. Us ve ark.’nın⁽³⁹⁾ çalışmasında ise iki hastada (2/229, %0.87) koenfeksiyon saptanmıştır (bir virüs + virüs, bir bakteri + virüs).

Diğer Etkenler Ekarte Edilerek Araştırılan Virüsler: Diğer etkenlerin ekarte edilerek yapıldığı çalışmalar için: BNV PZR iki yayın^(19,20), bir kongre bildirisi⁽⁴⁰⁾ ve bir tez çalışmasında⁽⁴¹⁾; TOSV PZR iki yayın^(19,20) ve bir kongre⁽⁴⁰⁾ bildirisinde; TBV ile BuV PZR bir yayında^(19,21); LCMV PZR ise bir kongre bildirisinde⁽⁴⁰⁾ çalışılmıştır.

Dört çalışmadaki toplam 436 BOS örneğinde BNV değerlendirilmiş, Öcal ve ark.’nın⁽²⁰⁾ çalışmasında bir BOS örneği etken pozitif saptanmıştır (1/93, %1.08). Toskanavirüs PZR ise 389 örnekte çalışılmış, yine aynı çalışmada bir örnek etken pozitif saptanmıştır (1/93, %1.08). Hem BNV ve hem TOSV için, araştırılan çalışmalarda PZR pozitiflik yüzdelерinin ortanca değeri yüzde sıfır olduğu görülmektedir. Tick-Borne virüs, LCMV ve BuV ise sırasıyla 234, 62 ve 126 BOS örneğinde çalışılmış olup hiçbirinde aranan etken saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Çalışmamızdaki bibliyometrik incelemeler, Türkiye’de son on yılda yapılan viral SSS enfeksiyonları sıklığına dair yapılan çalışmalara dair kalitatif ve kantitatif analizleri içermektedir. Aynı zamanda bu çalışmaların çıktılarının karşılaştırılmasını ve görselleştirilmesini sağlayarak bu alanda yapılan bilimsel araştırmalara dair içgörü oluşmasını sağlamaktadır. Bu sayede Türkiye’de viral SSS enfeksiyonlarının epidemiyolojisine dair çalışmaların literatürdeki yerinin ve etkisi-

nin ortaya konabilmesi sağlanmaktadır.

Konuyla ilgili maksimum kapsayıcılığa ulaşmak amacıyla, yayın haline getirilmemiş kongre bildirimleri ve SCI kapsamında olmayan yayınlar da taranmış ve çalışmaya dâhil edilmiştir. Bu durumun bir dezavantajı, değerlendirilmek istenen çalışmaların bir kısmının WoS, PubMed gibi uluslararası veri tabanlarında bulunmaması ve dolayısıyla daha ayrıntılı değerlendirmelerin yapılmasını sağlayacak veri setlerini elde etmede yaşanan zorluklardır. Özellikle kongre bildirimleri herhangi bir veri tabanında bulunmamaktadır. Bu da araştırmacı için zorluk teşkil etmektedir.

Ek olarak yakın dönemde yayınlanmış çalışmaların, yayımlandıkları tarihten itibaren geçen sürenin kısıtlılığı sebebiyle, bu çalışmada, atıf sayısı göreceli olarak daha az bulunmuş olabilir. Çalışmaların literatüre etkisi bağlamında yine son dönem kongre bildirimlerinin de ileriki dönemlerde yayın olması ihtimali söz konusudur. Bu durumun çalışmalar değerlendirilirken göz önünde bulundurulmasında fayda vardır.

Değerlendirilen çalışmaların çoğunluğunu oluşturan ve bildiri özeti şeklinde olan gri literatürde saptanan BOS sayısının, toplamın kabaca yarısını oluşturduğu görülmektedir. Bu durum halihazırda SSS enfeksiyonlarında viral etkenlerin insidansının belirlenmesi hususunda ülkemizde zaten çok fazla olmayan çalışmaların büyük bir kısmının literatüre kazandırılmadığını göstermektedir.

Birçok kongre bildirisi yayın kadar ayrıntılı veri barındırmamaktadır. Bu nedenle kongre bildirimlerinin birçoğunda demografik veriye ulaşılamamıştır. Özellikle PZR pozitif hastaların cinsiyet özellikleri ve yaş gruplarına ait veriler çok az çalışmada belirtilmiştir. Çalışmalarda hastaların hospitalizasyon bilgileri, yatışları servis, mortalite - morbidite oranları ve klinik özellikleri hakkında veri bulunmamaktadır. Bu nedenle etkenin pozitifliği ve hastaların klinik özellikleri hakkında herhangi bir ilişki de kurulamamaktadır. Bu alanda klinikle beraber yapılacak çalışmalar ile bu eksik noktalar aydınlatılabilir. Ülkemizde klinik ile

ilişkilendirilen çalışmalar olmasına rağmen, yayınlanan veriler genelde uluslararası çok merkezli çalışmalar arasındadır ya da bu çalışmalar menenjit dışı SSS enfeksiyonlarını da kapsayan veya viral etkenlerin de irdelendiği verileri içermemektedir⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

Çalışmalarda etkenin saptanabilmesi için kullanılan kitler çeşitlilik göstermektedir. Bu kitlerin her birinin kendine ait duyarlılık ve özgüllük değerleri vardır fakat bu değerlerdeki farklılıklar ihmal edilebilecek düzeydedir⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Dolayısıyla bu küçük farklılıklar bu çalışmada da ihmal edilmiş ve çalışmalar kitlere göre ayrılmamıştır. Gelecek çalışmalarda aynı menenjit / ensefalit kitlerinin kullanımı, yöntemi standardize edebilmek ve güvenilirliği daha da arttırabilmek adına yararlı olabilir.

Yapılan çalışmaların yayınlandığı / bildirildiği yıllara bakıldığında 2017 yılında ve devamında bir artış olduğu göze çarpmaktadır. Özellikle 2015 yılından sonra multipeks menenjit / ensefalit kitlerinin kullanımında artış olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu tarz moleküler kitlerin kullanımındaki artışın, yapılan çalışmaların sayısını da arttırdığı söylenebilir. Moleküler yöntemlerin kullanımının artması, bu alanda yapılan çalışmaların da artmasına ve böylece ülkemizde görülen viral etiyolojiye bağlı SSS enfeksiyonlarının da sıklığına yönelik daha zengin ve güvenilir verilerin elde edilebilmesini sağlayacaktır.

Çalışmalara alınan BOS örneklerinin toplandığı merkezler değerlendirildiğinde, bu merkezlerin bulunduğu kentlerin çoğunluğunun Türkiye'nin batısında olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada değerlendirilen veriler Türkiye'nin batısını temsil etmektedir. Doğu Anadolu Bölgesi'nden bir adet çalışma bulunmakla birlikte, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu bölgelerde yapılacak çalışmalar Türkiye'nin tamamını yansıtan verilerin elde edilmesini ve daha sağlıklı değerlendirmelerin yapılmasını sağlayacaktır.

On yıl boyunca her zaman aralığından BOS örnekleri-

nin toplandığı dikkati çekmektedir. İlk beş yılın genelinde uzun zaman aralıklarını kapsayan yayınlardan oluştuğu görülmektedir. Bu çalışmaların içinde 2010 öncesi toplanmaya başlanan BOS örnekleri vardır^(10,12,15). Son beş yılda ise daha kısa zaman aralıklarında yapılmış kongre bildirimleri çoğunluğu oluşturmaktadır. Bunun nedeni son beş yılı kapsayan aralıkta BOS örneklerinin toplandığı çalışmaların daha yayınlanmamasından kaynaklanıyor olabilir. Aynı zamanda 2019'un son aylarında BOS örneği toplandığı görülmemektedir. Bunun nedeni 2020'den sonra yapılmış / yapılacak çalışmaların derlemeye dâhil edilmemesidir. Derlemeye dâhil edilmiş çalışmalar içinden 2010 öncesi toplanmış BOS örneklerinin olması ve 2020'den sonra yayınlanan / bildirilen ve hedef tarihleri kapsayan çalışmaların derlemeye dâhil edilmemesi çalışmanın kısıtlılıklarındandır.

Değerlendirilen etkenler içinde en sık saptanan EV olmuştur. Enterovirüs, tüm yaş gruplarında viral menenjite sebep olsa da, pediatrik yaş özellikle dikkat edilmesi gereken bir risk faktörüdür⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Bu çalışmada içinde EV PZR pozitif hastalarda yaş gruplarının belirtildiği yalnızca üç adet çalışma olmakla birlikte sonuçlarda pediatrik yaş grubu çoğunluğu oluşturmaktadır. Değerlendirilen çalışmalarda hastaların aldıkları ön tanımlar menenjit ve ensefalit olarak ayrılmamıştır ve birçoğunda SSS enfeksiyonu ön tanısı ile incelemeler yapılmıştır. Öte yandan EV aseptik menenjitte ciddi oranlarda pozitif saptansa da parankim tutulumu nadirdir⁽⁵¹⁾. Dolayısıyla literatür bilgisiyle bağlantılı olarak, EV oranlarının, araştırılan hastaların çoğunlukla menenjit ön tanılı olduğu bilgisi göz önünde bulundurularak değerlendirilmesi gereklidir. Moleküler yöntemlerin kullanıldığı yeni çalışmaların klinikle eşgüdümü olması ve bu çalışmalarda hasta grubu tanımlanırken standardizasyona gidilmesi ile menenjit, ensefalit ve meningoensefalit ön tanı / ayırıcı tanıları yapılabilir ve çeşitli enfeksiyöz SSS patolojilerinde farklı viral etkenlerin sıklığı karşılaştırılabilir. Bu ayırım özellikle EV ve HSV1 karşılaştırmasında önemlidir.

Bu noktada klinik ön tanıyla ilgili olarak, derlemeye

dâhil edilen bazı çalışmaların ‘menenjit’ ya da ‘SSS enfeksiyonu’ ön tanılı hastalarda etken araştırırken, diğer çalışmaların ‘viral’ SSS enfeksiyonu ya da ‘aseptik / viral’ menenjit ön tanılı hastalarda etken araştırıldığı belirtilmelidir. Dolayısıyla çalışmaya dâhil edilen hasta grubu değişikliklerinden kaynaklanabilecek istatistiki farklılık ihtimali de göz ardı edilmemelidir.

Enterovirüsten sonra en sık saptanan ikinci etken olan HSV, tipinin belirtilmediği çalışmaların da olmasından dolayı HSV (Toplam), HSV1 ve HSV2 şeklinde üç ayrı kategoriye ayrılarak değerlendirilebilmiştir. Herpesvirüsler içinden özellikle HSV1, mediyotemporal ve orbitofrontal bölgeyi tutan sporadik nekrotizan ensefalit tablosuna yol açan, hemorajik komplikasyonları olabilen bir ajandır ve hala ensefalitin en sık etkeni olarak bildirilmektedir⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Etkin tedavisinin yapılmasına ve ampirik tedavisinin başlanmasına karşın hala mortalite oranları⁽⁵²⁾ kabul edilemez seviyededir ve ciddi sekellere⁽⁵⁵⁾ yol açabilmesine, sağlık sistemlerine ciddi oranlarda yük oluşturduğu bilinmesine rağmen ülkemizde maalesef HSV ensefalitinin insidansına dair veri bulunmamaktadır. HSV’nin ülkemizdeki durumuyla ilgili ayrıntılı epidemiyolojik verilerin oluşturulabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada ise ensefalit ön tanısı ile çalışma yapan yalnızca bir yayın saptanmış olup kalanları ya menenjit ya da SSS enfeksiyonu ön tanısıyla etken araştırmıştır. Dolayısıyla bu derlemenin HSV açısından çıkardığı sonuç, öncelikle menenjit olmak üzere SSS enfeksiyonlarındaki HSV pozitifliği ile ilgili genel bir orandır.

Herpes simpleks virüs DNA PZR pozitif hastaların demografik verilerinin bildirildiği yayınlar değerlendirildiğinde erişkin kadın grubun daha çok etkilendiği görülmektedir. Fakat bu bilgiler yapılan çalışmaların yalnızca az bir kısmında bildirilmiştir. Bu nedenle daha güvenilir verilerin oluşması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Literatürde bu konuda çeşitli veriler bulunmaktadır. Geroge ve ark.’nın⁽⁵²⁾ yaptığı, ABD’deki 2000-2010 yılları arasındaki ensefalit vakalarıyla ilgili çalışmada, HSV 1 ve 2 kaynaklı hospitalizasyon oranları her 100.000 kişide erkekler için

1.02±0.04 iken kadınlar için 1.01±0.03 olarak hesaplanmış ve HSV’ye bağlı enfeksiyonların sıklığının uç yaşlarda (< 1 yaş ve ≥ 65 yaş grubu) arttığı bildirilmiştir. Bernard ve ark.’nın⁽⁵⁴⁾ Fransa’yı kapsayan çalışmasında ise HSV’ye bağlı ensefalit oranlarında yaş ve cinsiyete bağlı herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Bu derlemede hem EV hem de HSV için erişkin yaş grubunda bulunan PZR pozitif hastaların içine geriatrik hastalar da dâhildir (≥ 18 yaş). Dolayısıyla bu etkenlerin uç yaşlardaki sıklığına dair herhangi bir yorum yapmak mümkün olamamaktadır. Geriatrik grubun da ayrı olarak değerlendirildiği çalışmaların yaygınlaşmasıyla on sekiz yaş üstü grupta sık karşılaşılan etkenlerin erişkin / geriatrik ayrımı yapılabilir.

Herpes simpleks virüs ve EV’nin ardından en sık rastlanan etkenlerin HHV6 ve AdV olduğu saptanmıştır. HHV6’nın SSS dokularında saptanması klinik açıdan anlamsız olabilmektedir^(56,57). HHV6’nın araştırıldığı çalışmaların ikisinde klinik anlamlılık değerlendirilmiştir fakat diğer etkenler için hiçbir çalışmada böyle bir değerlendirme yapılmamıştır. Bu nedenle yeni çalışmalarda PZR sonuçlarının hastanın kliniğiyle beraber değerlendirilmesi, virüsün etkisiz ‘bystander’ ya da etiyojiden sorumlu olduğunun belirlenmesinde yardımcı olarak daha ayrıntılı verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Hastaların klinikle ilişkili değerlendirilememelerinin bir dezavantajı da immünsupresyon durumları hakkında verilerin olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu verilerin olmaması özellikle EBV ve CMV gibi immünsupresyon ile ilişki olduğu bilinen etkenleri değerlendirirken zorluk oluşturmaktadır. Türkiye’de yapılan çalışmaların çoğunun üçüncü basamak sağlık kuruluşlarından ve büyük üniversite hastanelerinden olması hasta gruplarındaki immünsupresyon ve ek hastalık oranlarının düşük olmadığını düşündürmektedir.

Kızamık, kabakulak ve HBoV ile yapılmış çalışmalar ise yorum yapılamayacak kadar az sayıdadır. HBoV’un etkisiz ‘bystander’ olma durumu göz ardı edilmemelidir. BNV, TBV, TOSV, LCMV, BuV gibi etkenlerin araş-

tırıldığı çalışmalar az olduğundan ve diğer etkenlerin ekarte edildiği BOS örnekleri kullanıldığından bu etkenlerin diğerleriyle beraber değerlendirilmesi mümkün olamamıştır. 2010 yılında Türkiye genelinde 47 BNV vakası bildirilmiş Türkiye geneli insidansı 0.19/100.000 olarak saptanmıştır⁽⁵⁸⁾. Aynı yıl Avrupa'daki yıllık toplam olgu sayısı 262'dir. 2019 yılında AB ülkeleri toplamda 410 vaka bildirirken, Sırbistan 27, İsrail ve Türkiye 10, Kuzey Makedonya ise 6 vaka bildirmiş yapmıştır⁽⁵⁹⁾.

Koenfeksiyon saptanan beş çalışmanın hepsinde EV'nin saptandığı görülmektedir. Bu derlemede çalışmalarda saptanan viral + viral ve viral + bakteriyel koenfeksiyon durumları belirtilmiş olup herhangi bir istatistiki çıkarım yapılmamıştır. Ülkemizdeki SSS enfeksiyonlarında koenfeksiyon durumlarının değerlendirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak SSS enfeksiyonlarının viral etiyolojilerinin değerlendirildiği ve bibliyometrik olarak incelendiği bu çalışmada, Türkiye'nin hem etkenler hem de bu alanda yapılan çalışmalar açısından son on yıldaki durumunun bir analizi yapılmıştır. Çıkan sonuçlar dünya literatürüyle benzer olup en sık EV ve HSV1 saptanmıştır. Çalışmalarda en sık araştırılan etkenler de yine bu ajanlardır. Bu etkenlerin sıklığının bilinmesi tanı ve tedavi yaklaşımını etkileyecektir. Türkiye'deki etkenlerinin sıklığının belirlenmesi ve yeterli epidemiyolojik verilerin elde edilmesi için de daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. Yeni nesil PZR yöntemlerinin yaygınlaşmasıyla bu etkenlerin saptanması daha hızlı ve kolay bir hale gelmiştir. Moleküler yöntemlerin ve panellerin kullanımının artmasıyla bu alanda daha çok çalışmanın yapılması beklenmektedir.

Etik Kurul Onayı: Değerlendirmeye alınan her bir çalışmanın kendi etik kurul onayı bulunup bu çalışma için etik kurul onayı gerekli değildir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Gerekli değildir.

Ethics Committee Approval: Not required. All the studies included in this article are approved by their own ethics committee.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: The authors declared that this study received no financial support.

Informed Consent: Not applicable.

KAYNAKLAR

1. Lipkin WI, Hornig M. Diagnostics and discovery in viral central nervous system infections. *Brain Pathol.* 2015;25(5):600-4. <https://doi.org/10.1111/bpa.12277>
2. Granerod J, Tam CC, Crowcroft NS. Challenge of the unknown: A systematic review of acute encephalitis in non-outbreak situations. *Neurology.* 2010;75(10):924-32. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f11d65>
3. Wilson MR, Tyler KL. Issues and updates in emerging neurologic viral infections. *Semin Neurol.* 2011;31(3):245-53. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1287650>
4. Tyler KL. Emerging viral infections of the central nervous system: Part 1. *Arch Neurol.* 2009;66(8):939-48. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.153>
5. Tyler KL. Emerging viral infections of the ventral nervous system: Part 2. *Arch Neurol.* 2009;66(9):1065-74. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.189>
6. Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, et al. The management of encephalitis: Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;47(3):303-27. <https://doi.org/10.1086/589747>
7. Boucher A, Herrmann JL, Morand P, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. *Med Mal Infect.* 2017;47(3):221-35. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.02.003>
8. He T, Kaplan S, Kamboj M, Tang YW. Laboratory diagnosis of central nervous system infection. *Curr Infect Dis Rep.* 2016;18(11):1-21. <https://doi.org/10.1007/s11908-016-0545-6>
9. Günaydın B, Şafak B, Gülen D, Erdal B, Kiraz N. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen BOS örneklerinin moleküler ve konvansiyonel yöntemlerle değerlendirilmesi. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim-01 Kasım

- 2019, Bayraklı, İzmir; 2019:P215.
10. Gültepe B, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Berktaş M. Investigation of bacterial and viral meningitis agents with different PCR methods at a university hospital. *Abant Med J.* 2015;4(2):125-9. <https://doi.org/10.5505/abantmedj.2015.64325>
 11. Kahraman H, Tünger A, Şenol Ş, ve ark. Toplum kökenli santral sinir sistemi enfeksiyonlarında bakteriyel ve viral etiyolojinin moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2017;51(3):277-85. <https://doi.org/10.5578/mb.57358>
 12. Kaşifoğlu N, Aslan M, Durmaz G, Us T. Santral sinir sistemi enfeksiyonlarında, Herpes Simplex Virüs varlığının beyin omurilik sıvısı örneklerinde real-time PZR yöntemiyle araştırılması. *Osmangazi J Med.* 2017;39(3):62-7. <https://doi.org/10.20515/otd.307373>
 13. Akkaya O, Güvenç HI, Yüksekaya Ş, et al. Real-time PCR detection of the most common bacteria and viruses causing meningitis. *Clin Lab.* 2017;63(4):827-32. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160912>
 14. Çiftçi Kavaklıoğlu B, Çoban E, Şen A, et al. Review of viral encephalitis cases seen at a tertiary care center in Turkey: Focus on Herpes Simplex Type 1. *Noropsikiyatri Ars.* 2017;54(3):209-15. <https://doi.org/10.5152/npa.2016.12540>
 15. Zeytinoğlu A, Erensoy S, Sertöz R, ve ark. Santral sinir sistemi enfeksiyonlarında viral etiyolojinin İzmir'de bir üniversite hastanesinin yedi yıllık verileri üzerinden değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2017;51(2):127-35. <https://doi.org/10.5578/mb.53825>
 16. Terzi HA, Aydemir Ö, Karakeçe E, Köroğlu M, Altındış M. Viral ensefalit/menenjit şüpheli hastalarda, beyin omurilik sıvısı örneklerinde Herpes Simplex virüslerinin real-time PZR ile araştırılması. *SDU Sağlık Bilim Derg.* 2018;9(4):17-20. <https://doi.org/10.22312/sdusbed.425323>
 17. Şirin MC, Göktaş Ş. Determination of the prevalence of viral, bacterial and fungal pathogens causing meningitis by using multiplex real-time polymerase chain reaction. *Acta Medica Mediterr.* 2018;34:127. <https://doi.org/10.19193/0393-6384>
 18. Varıcı Balcı FK, Sayiner AA. Viral etkenlere bağlı santral sinir sistemienfeksiyonlarınınyediyıllıkdeğerlendirmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2019;53(4):434-41. <https://doi.org/10.5578/mb.68012>
 19. Ergunay K, Sayiner AA, Litzba N, et al. Multicentre evaluation of central nervous system infections due to Flavi and Phleboviruses in Turkey. *J Infect.* 2012;65(4):343-9. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.05.010>
 20. Öcal M, Orsten S, Inkaya AC, et al. Ongoing activity of Toscana Virus Genotype A and West Nile Virus Lineage 1 Strains in Turkey: A clinical and field survey. *Zoonoses Public Health.* 2014;61(7):480-91. <https://doi.org/10.1111/zph.12096>
 21. Koçak AA, Öcal M, Polat M, ve ark. bufavirusun çocuklar ve erişkinlerdeki viral santral sinir sistemi enfeksiyonlarının etiyolojisi açısından çok merkezli olarak araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2017;51(2):191-4. <https://doi.org/10.5578/mb.54035>
 22. Sağlık İ, Sarınoğlu RC, Mutlu D, ve ark. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Epstein-Barr Virus (EBV) DNA'sının araştırılması için gönderilen örneklerin değerlendirilmesi. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 10-13 Kasım 2013, Belek, Antalya; 2013:PS447.
 23. Sağlık İ, Sarınoğlu RC, Mutlu D, ve ark. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Adenovirus DNA'sının araştırılması için gönderilen örneklerin değerlendirilmesi. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 10-13 Kasım 2013, Belek, Antalya; 2013:PS467.
 24. Feyzioğlu B, Özdemir M, Yavru S, Baykan M. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonu düşünülen olgularda Herpes grubu virüslerin Konya bölgesinde son 3 yıldaki dağılımı. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Kasım 2014, Belek Antalya; 2014:PS-349.
 25. Çorabatır Dirim C, Tezcan Ülger S, Aslan G, ve ark. Aseptik menenjit şüpheli hastalara ait BOS örneklerinde Human Parechovirus ve enterovirusların araştırılması. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2015, Belek, Antalya; 2015:PS365.
 26. Şirin CM, Göktaş Ş. Real-Time Multiplex PCR kullanarak, 23 menenjit etkeni ile ilgili aldığımız sonuçlar. XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya; 2016:PS-273.
 27. Sağlık İ, Sarınoğlu RC, Peker BO, Mutlu D, Özhak Baysan B, Çolak D. Aseptik menenjit hastalarının BOS örneklerinde enterovirüslerin araştırılması. XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya; 2016:PS-334.
 28. Altay Koçak A, Öcal M, Ergünay K, Özkul A, Bozdayı G. Investigation of enterovirus RNA in patients with central nervous system infections. 20th European Society for Clinical Virology Annual Meeting, Stresa, Italy; 2017:090.
 29. Akkaya O, Kaya M, Övet H, ve ark. Konya bölgesinde görülen menenjit etkenlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi. 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 08-12 Kasım 2017, Antalya; 2017:PS-224.

30. Can Sarinoğlu R, Aksu B, Saran B, Söyletir G. Detection of central nervous system (CNS) pathogens by multiplex PCR in cerebrospinal fluid (CSF) samples. 21st European Society for Clinical Virology Annual Meeting, 23-26 September 2018, Atina, Yunanistan; 2018:P266.
31. Bayrakdar F, Coşgun Y, Gülay K. 2014-2018 yılları arasında aseptik menenjit vakalarından izole edilen enteroviruslerin moleküler epidemiyolojisi. International XXXVIII. Turkish Microbiology Congress, 04-08 November 2018, Antalya, Türkiye; 2018:PS-276.
32. Çiçek C, Zeytinoğlu A, Dinç Z, ve ark. BOS'da saptanan HBOV: Menenjit ve ensefalit etkeni mi? International XXXVIII. Turkish Microbiology Congress, 04-08 November 2018, Antalya, Türkiye; 2018:SS-053.
33. Çiçek C, Zeytinoğlu A, Erensoy S, et al. Prospective evaluation of rapid syndromic molecular panel in patients with meningitis and encephalitis. 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 11-14 September 2019, Kopenhag, Danimarka; 2019:P153.
34. Dündar D, Toçoğlu H. Filmarray Menenjit/Ensefalit paneli sonuçlarının değerlendirilmesi. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim-01 Kasım 2019, Bayraklı, İzmir; 2019:P216.
35. Çetin Duran A, Kula Atik T. Menenjit etkenlerinin real-time PCR yöntemiyle araştırılması ve biyokimyasal sonuçlarla karşılaştırılması. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim-01 Kasım 2019, Bayraklı, İzmir; 2019:P217.
36. Yılmaz N, Şamlıoğlu P, Bayram A, Doğan G, Yılmaz Hancı S. Üçüncü basamak bir hastane laboratuvarında beyin omurilik sıvısında izole edilen bakteriyel ve viral etkenlerin beş yıllık değerlendirilmesi. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim-01 Kasım 2019, Bayraklı, İzmir; 2019:P218.
37. Cezaroğlu Y, Kaygısız G, Sesli Çetin E, Şirin MC, Cicioğlu Arıdoğan B. Multiplex real-time PCR yöntemi ile BOS örneklerinden izole edilen bakteriyel ve viral menenjit etkenlerinin incelenmesi. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim-01 Kasım 2019, Bayraklı, İzmir; 2019:P219.
38. Önel M, Mehdiyeva A, Yaman M, Bolat E, Ağaçfidan A. Beyin omurilik sıvısı örneklerinde viral menenjit etkelerinin multiplex real time PCR yöntemi ile retrospektif olarak araştırılması. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim-01 Kasım 2019, Bayraklı, İzmir; 2019:P220.
39. Us T, Erşen T, Durmaz G, Kaşifoğlu N. santral sinir sistemi enfeksiyon etkenlerinin multiplex PCR yöntemiyle tanımlanması. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim-01 Kasım 2019, Bayraklı, İzmir; 2019:P221.
40. Kuşkucu MA, Ergin S, Abdelkareem A, Gözün E, Midilli K. Rutin inceleme ile negatif bulunan beyin omurilik sıvısı örneklerinde Batı Nil Ateşi Virusü, Toscana Virusü ve Lenfosittik Koriomenenjit Virusü'nün araştırılması. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012, Kuşadası, Aydın; 2012:P203.
41. Bayar Z. Santral sinir sistemi enfeksiyonu ön tanı hastalarının kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinde Batı Nil Virüsü'nün araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması. [Doktora tezi]. Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2015.
42. Balin ŞÖ, Sağmak Tartar A, Demirdağ K, Akbulut A. Analysis of patients with central nervous system infection at our clinic: Five-year Results. *Mediterr J Infect Microbes Antimicrob*. 2019;8:2-9. <https://doi.org/10.4274/mjima.galenos.2019.2019.13>
43. Sipahi OR, Nazlı Zeka A, Taşbakan M, et al. Pooled analysis of 899 nosocomial meningitis episodes from Turkey. *Turkish J Med Sci*. 2017;47(1):29-33. <https://doi.org/10.3906/sag-1508-102>
44. Erdem H, Inan A, Guven E, et al. The burden and epidemiology of community-acquired central nervous system infections: a multinational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(9):1595-611. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2973-0>
45. Reil H, Bartlime A, Drerup J, Grewing T, Korn K. Clinical validation of a new triplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and discrimination of Herpes simplex virus types 1 and 2. *J Mol Diagnostics*. 2008;10(4):361-7 <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.070104>.
46. Wolffs PFG, Vink C, Keijndener J, et al. Evaluation of MeningoFinder, a novel multiplex ligation-dependent probe amplification assay for simultaneous detection of six virus species causing central nervous system infections. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2620-2. <https://doi.org/10.1128/JCM.02436-08>
47. Walls T, McSweeney A, Anderson T, Jennings LC. Multiplex-PCR for the detection of viruses in the CSF of infants and young children. *J Med Virol*. 2017;89(3):559-61. <https://doi.org/10.1002/jmv.24461>
48. Rotbart HA. Viral Meningitis. *Semin Neurol*. 2000;20(2):277-92. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9427>
49. Michos AG, Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C, et al. Aseptic meningitis in children: Analysis of 506 cases. *PLoS One*. 2007;2(7):e674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000674>
50. Romero JR. Diagnosis and management of enteroviral

- infections of the central nervous system. *Curr Infect Dis Rep.* 2002;4(4):309-16.
<https://doi.org/10.1007/s11908-002-0023-1>
51. Rudolph H, Schrotten H, Tenenbaum T. Enterovirus infections of the central nervous system in children: An update. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35(5):567-9.
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001090>
52. George BP, Schneider EB, Venkatesan A. Encephalitis hospitalization rates and inpatient mortality in the United States, 2000-2010. *PLoS One.* 2014;9(9):e104169.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104169>
53. Barbadoro P, Marigliano A, Ricciardi A, D’Errico MM, Prospero E. Trend of hospital utilization for encephalitis. *Epidemiol Infect.* 2012;140(4):753-64.
<https://doi.org/10.1017/S0950268811001002>
54. Bernard S, Mailles A, Stahl JP. Epidemiology of infectious encephalitis, differences between a prospective study and hospital discharge data. *Epidemiol Infect.* 2013;141(11):2256-68.
<https://doi.org/10.1017/S0950268812002518>
55. Hjalmarsson A, Blomqvist P, Skoldenberg B. Herpes Simplex encephalitis in Sweden, 1990-2001: Incidence, morbidity, and mortality. *Clin Infect Dis.* 2007;45(7):875-80.
<https://doi.org/10.1086/521262>
56. Sgarabotto D, Buoro S, Mengoli C, et al. PCR in meningoencephalitis diagnosis. *Scand J Infect Dis.* 2000;32(6):689-92.
<https://doi.org/10.1080/003655400459649>
57. Pandey U, Greninger AL, Levin GR, Jerome KR, Anand VC, Dien Bard J. Pathogen or bystander: clinical significance of detecting HHV-6 in pediatric CSF. *J Clin Microbiol.* 2020;58(5):e00313-20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00313-20>
58. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Surveill Outbreak Reports.* 2012;17.
59. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Historical data by year - West Nile fever seasonal surveillance. West Nile Fever data, 2018. [<https://ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical>]. (Erişim tarihi: 2.4.2020)

Human Papillomavirüs DNA Pozitif ve E6/E7 mRNA Negatif, Anormal Sitolojili Servikal Örneklerin Genotiplendirilmesi^S

Genotyping of HPV DNA Positive and HPV E6/E7 mRNA Negative Cervical Samples with Abnormal Cytology

Aylin Altay Koçak*¹, İpek Tüney**¹, Koray Ergunay**¹, Alp Usubütün***¹, Kunter Yüce****¹
Irene Görzer*****¹, Elisabeth Puchhammer-Stöckl*****², Güleendam Bozdayı*****³

*Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

***Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

****Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*****Medical University Vienna, Department of Virology, Viyana, Avusturya

*****Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

Atf/Cite as: Altay Koçak A, Tüney İ, Ergunay K, Usubütün A, Yüce K, Görzer I, Puschhammer-Stöckl E, Bozdayı G. Human papillomavirüs DNA pozitif ve E6/E7 mRNA negatif, anormal sitolojili servikal örneklerin genotiplendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):86-8.

Sayın Editör,

Servikal karsinom, başlıca jinekolojik malignansilerdendir ve insan papillomavirüslerinin (HPV) bu karsinomun etiyolojisinde yer aldığı bilinmektedir. İnvazif serviks kanseri olan hastaların HPV ile enfekte olduğu bildirilmektedir. Başlıca olarak, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 ve 58 gibi tipler servikal karsinom ile ilişkilidir^(1,2). Özellikle L1 proteininin DNA ve aminoasit dizileri, HPV tipleri arasında oldukça korunmuştur. HPV genotiplerinin tanımlanmasında PCR temelli çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Herbir genotip tipe-özümlü PCR primer setleri ile saptanabilmektedir⁽³⁾. Kansere yol açan E6 veya E7 gen bölgelerini hedefleyen PCR yöntemleri ise, farklı HPV tipleri arasındaki nükleotid dizilerindeki en büyük farklılıklara sahip olduğu ve enfekte hücreler tarafından her zaman korunduğu için önemlidir. En büyük dezavantaj, viral genomun konak hücre genomuna tamamen entegre bir biçimde olması halinde, bunun potansiyelinin bulunmamasıdır. Dolayısıyla, PCR için hedef, E6 ve E7 dışındaki bölgeler için mevcut olmayabilmektedir. Diğer yandan, E6 ve E7 gen bölgelerini hedeflemek; ilgili primerler kullanıldığı takdirde, yüksek-riskli HPV tipleri ile olan tüm örnekleri saptayabilmektedir^(4,5).

Bu çalışmada, daha önceki çalışmamızda HPV DNA pozitif ve mRNA negatif bulunan örneklerin; HPV tanısında yaygın olarak kullanılan L1 ve E6/E7 bölgelerini hedefleyen farklı primer setleri kullanılarak, en sık karşılaşılan HPV genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Alındığı tarih / Received:
15.09.2020 / 15.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:
03.01.2021 / 03.January.2021

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

A. Altay Koçak 0000-0002-0451-0142
İ. Tüney 0000-0002-2850-2171
K. Ergünay 0000-0001-5422-1982
A. Usubütün 0000-0001-9572-7875
K. Yüce 0000-0001-7768-8278
I. Görzer 0000-0003-1936-0404
E. P. Stöckl 0000-0002-0673-8335
G. Bozdayı 0000-0002-6036-6819

✉ aylnalty@hotmail.com

* Bu çalışma XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

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

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

Önceki çalışmamızda HPV mRNA ve DNA varlığı değerlendirilen anormal sitolojili servikal sürüntü örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları Doğum Polikliniğine 2011 Ocak-Ekim arasında başvurmuş hastalardan toplanmıştır. HPV DNA ve E6/E7 mRNA saptanması için, Real-time PCR (Heliosis HPV LC PCR Kit, Metis Biyoteknoloji, Türkiye) ve NASBA yöntemi (NucliSENS EasyQ HPV v1.1, bioMerieux, France) kullanılmıştır. HPV DNA saptamak için kullanılan yöntem 'HPV-16 veya HPV-16 dışı pozitif' şeklinde sonuç verirken, NASBA yöntemi ise HPV-16, 18, 31, 33 ve 45 tiplerindeki mRNA pozitifliklerini saptamaktadır. HPV-18, 31, 33, 35, 39 ve 45'in genotiplendirilmesi için L1 gen bölgesini hedefleyen tipe özgü 'PGMY' primerleri⁽⁶⁾ (Metis Biyoteknoloji, Türkiye); E6/E7 geninin saptanması için E6/E7 ortak primerleri⁷ (Helix Biotechnology, Türkiye) ile standart PCR yöntemi (PCR mastermix, Promega, ABD) kullanılmıştır. Primer dizileri, BioEdit 3.0 programında HPV referans suşları ile karşılaştırılarak kontrol edilmiştir. Sonuçların confirmasyonu ise, 'LineProbe' yöntemi (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp, Innogenetics, Belgium) ile yapılmıştır.

Önceki çalışma grubu, 81 anormal sitolojili kadın hastadan oluşmaktadır. Örneklerin 73'ünde (%90.1) HPV DNA saptanmış ve bunların 46'sını (%63.1) HPV-16, 15'ini (%20.5) HPV-16 dışı tipler ve 12'sini (%16.4) mikst tipler oluşturmuştur. E6/E7 mRNA ekspresyonu ise 45 (%55.6) örnekte gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, toplam 43 örnek olmak üzere; 28 HPV mRNA negatif, tip-16 DNA pozitif ve 15 tip-16 dışı DNA pozitif örneğin genotipleri belirlenmeye çalışılmıştır. HPV E6/E7 ortak primerleriyle, 43 örneğin 5'i (%12) pozitif bulunmuştur. Bunların 4'ü HPV-16 genotipine, 1'i ise tip-16 dışı pozitifliğe sahiptir. Genotiplendirme için ise, tip 18, 31, 33, 39 ve 45'e ait pozitif kontroller ile PCR optimizasyonları yapılmış ve tip 33 dışındakiler optimize edilerek pozitif kontrolleri iyi çalışmıştır. Tip 33'ün ise, pozitif kontrolü çalışmamış ve L1 bölgesini hedefleyen yeni bir primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Almanya) tasarlanmıştır. Ancak çeşitli PCR koşullarında denenmesine

rağmen optimize edilememiş ve tip 33 çalışma dışı bırakılmıştır. Bunun yanında, 43 örneğin hepsi genotip 18, 31, 39 ve 45 için 'in house PCR' ile negatif bulunmuştur. Bu nedenle, LiPA ile 12 örneğin doğrulama testi yapılmış ve 8'inde tip 6, 11, 16, 43, 53, 62, 81, 89 pozitif bulunmuştur. Bu tipler, standart PCR ile çalıştığımız genotiplerin dışındadır. Kalan 4 örneğin ise; ikisinde tip 33, diğer ikisinde tip 39 saptanmıştır. Ancak bu 4 örneğin hiçbirinde bu genotipler, standart PCR yöntemi ile saptanamamıştır. Sınırlı miktardaki örnek hacmi nedeni ile de tüm örnekler LiPA ile çalışılmamıştır.

LiPA bulgularına göre, örneklerin bir kısmı HPV 18, 31, 39 ve 45 genotiplerinden farklı olduğu için standart PCR ile negatif bulunmuştur. Bunun yanında, LiPA'nın 65 baz çiftlik bir bölgeyi çoğaltması nedeniyle, 238 ve 455 baz çiftlik bölgeleri çoğaltan 'in house PCR' yöntemlerimizden daha duyarlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle, bazı pozitif tipler saptanamamış olabilir. Ayrıca, E6/E7 gen bölgeleri, L1 bölgesi kadar korunmuş olmadığı için, daha çok negatif sonuç almak olasıdır. Konak hücre genomuna entegrasyon, çoğunlukla E2 ve E1'in, ayrıca L1 ve L2'nin de dahil olduğu büyük bölgelerin kaybına yol açmaktadır ve entegre HPV DNA'nın kalan kısımları, enfekte olmuş bir hücrede mevcut olan tek formu olabilmektedir. Bu da, silinen herhangi bir bölgeye yönelik primerler içeren PCR yaklaşımları için ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Diğer bir konu da HPV DNA mutasyonlarının, genomun L1 bölgesinde E6 bölgesinden daha sık gerçekleştiğidir. Bu, PCR primerlerinin hibridizasyona uygunluğunu ve dolayısıyla mevcut HPV'yi saptama yeteneğini etkileyebilmektedir⁴. Sonuç olarak, çalışmamızdaki HPV mRNA negatif-DNA pozitif örneklerin tipleri belirlenmeye çalışılmış ve mRNA negatifliğine yol açan etkenler araştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre; LiPA yöntemi ile genotiplendirilebilen örneklerin tiplerinin, HPV mRNA yönteminde taranan genotiplerden farklı olması nedeniyle mRNA pozitifliklerinin yakalanamadığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Buttman-Schweiger N, Deleré Y, Klug SJ, Kraywinkel K. Cancer incidence in Germany attributable to human papillomavirus in 2013. *BMC Cancer*. 2017;17(1):682. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3678-6>
2. Li P, Tan Y, Zhu L, et al. Prognostic value of HPV DNA status in cervical cancer before treatment: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(39): 66352-9. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18558>
3. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. *Expert Rev Mol Med*. 2017;19:e1. <https://doi.org/10.1017/erm.2017.2>
4. Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1171-7. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.20>
5. Lagheden C, Eklund C, Lamin H, et al. Nationwide comprehensive human papillomavirus (HPV) genotyping of invasive cervical cancer. *Br J Cancer*. 2018;118(10):1377-81. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0053-6>
6. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-61.
7. Hwang T. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean woman. *J Korean Med Sci*. 1999;14(6):593-9. <https://doi.org/10.3346/jk>

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 görülmezsizin yazarlarına iade edilir. Bu nedenle gereksiz yere zaman ve emek kaybına yol açılmaması için, yazı sahipleri dergi kurallarını dikkatli incelemek zorundadır.
- Dergi kurallarına uygunluğuna karar verilen yazılar Danışma Kurulundan veya konu ile ilgili kişilerden en az iki hakeme gönderilir ve hakemlerden yayına uygun olup olmadığı konusunda görüşleri alınır. Düzeltme isteniyorsa tekrar yazara gönderilir. Bu incelemeden geçen yazılar, Yayın Kurulu tarafından tekrar değerlendirilir ve basılacağı yer ve sayı kararlaştırılır.
- Danışma ve Yayın Kurulları; düzeltme, kontrol ve dizgi aşamasında yayıncı, yazılarda düzeltme yapmak, biçiminde değişiklikler istemek ve yazarları bilgilendirerek kısaltma yapmak yetkisine sahiptir. Yazarlardan istenen değişiklik ve düzeltmeler yapıldıkça kadar, söz konusu yazılar yayın programında sırada bekletilir.
- Teslim edilmiş bir metnin tümünün veya bir bölümünün bir başka yerde yayımlanması söz konusu olursa editörlere bilgi verilmesi zorunludur.

Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Tüm yazarların ORCID numaraları başvuru esnasında on-line olarak ilgili alana eklenmelidir. ORCID ID kaydı için <https://orcid.org> adresini kullanınız. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve teklif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak 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: tmcdditor@gmail.com

Metin Çeşitleri

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

Metin yazımı esnasında uyulacak kurallar

- Yazının Türkçe başlığı kısa, açık ve içeriği tam yansıtır olmalıdır.
- Yabancı dilde başlık Türkçe başlık ile birebir uyusmalıdır.
- 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:** Snyderman 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.
- **Sürelî resmi yayın:** TC Sağlık Bakanlığı. Bulaşıcı hastalıklar sürveyans ve kontrol esasları yönetmeliği. Resmi Gazete. 30.05.2007(26537).
- **Sürelî 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:** Başustaoglu AC, Süzük S, Mumcuoglu İ, ve ark. Kan kültürü uygulamalarının değerlendirilmesi: EpiCenter verilerinin kullanımını. XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya; 2016:TPS-85.
- **Tez:** Öktem İMA. Endoservikal sürüntü örneklerinde *Chlamydia trachomatis* hücre kültürü sonuçlarının direk floreson antikor (DFA) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile karşılaştırılması [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 1998.

C. Sanal Ortam

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

Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler Arap rakamları ile numaralandırılmalı ve yazı içinde geçtiği yerler belirtilmelidir.
- Tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne, sol kenardan başlanarak yazılmalı ve tablo sıra numarasından sonra nokta kullanılmalıdır. Örneğin; Tablo 1. *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.

