

Cilt / Volume 51
Sayı / Number 2
Haziran / June 2021

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516



Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✓ İnsan Mikrobiyomunun Karanlık Kutusu: Virobiyota ve Virom
- ✓ COVID-19 Pandemisinde Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri
- ✓ HIV Pozitif Kişilerde Cinsel Yolla Bulaşan Etkenlerin Sıklığı
- ✓ Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Vankomisine Direçli Enterokok (VRE) Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Değerlendirilmesi
- ✓ Kandidemi Etkenlerinin Tür Dağılımı ve Duyarlılıkları: Hastanemizde Ampirik Antifungal Tedavi Politikası Değiştirilmeli mi?
- ✓ Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'dan Elde Edilen Fajın Karakterizasyonu

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY



Cilt / Volume 51

Sayı / Number 2

Haziran / June 2021



TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 51 Sayı / Number 2 Haziran / June 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 Çiftçioğlu; İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Teknokent, 3. Kat No.324 Avcılar, 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: tmcdditor@gmail.com

www.tmc-online.org

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

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

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

Yayın Türü: Yerel Süreli

Basım Yeri / Printed by

LOGOS YAYINCILIK TİC. A.Ş.

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

34349 Gayrettepe-İstanbul



Tel: (0212) 288 05 41

Faks: (0212) 211 61 85

mail: logos@logos.com.tr

web: www.logosyayincilik.com

Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

Elif Aktaş, Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul
0000-0003-3087-5425

Orhan Cem Aktepe, Bahçeşehir Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul
0000-0003-1746-8008

Işın Akyar, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0003-1115-0429

Alpaslan Alp, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Ankara
0000-0001-7856-7590

Gülçin Bayramoğlu, Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Trabzon
0000-0002-6103-3127

Mehmet Baysallar, Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Ankara
0000-0002-2497-7348

Rukiye Berkem, Ankara Eğitim ve Araştırma
Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara
0000-0002-7035-4723

Gülendam Bozdayı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0002-6036-6819

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

Emel Sesli Çetin, Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Isparta
0000-0001-5231-3824

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

Koray Ergünay, Hacettepe Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Ankara
0000-0001-5422-1982

Duygu Fındık, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya
0000-0002-0342-0364

Işıl Fidan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0001-6296-5017

Gonca Erköse Genç, Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul
0000-0002-8983-9675

Zeynep Ceren Karahan, Ankara Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Ankara
0000-0001-7727-3363

Deniz Bahar Akgün Karapınar, İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0002-3470-5346

Selçuk Kaya, Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk
Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-8637-6345

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

Ayşe Nedret Koç, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri
0000-0002-1736-9707

Ayşegül Kubilay, Isparta Uygulamalı Bilimler
Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta
0000-0002-6043-2599

İpek Mumcuoğlu,
0000-0002-6392-8880

Cüneyt Özakin, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa
0000-0001-5428-3630

Betil Özhak, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya
0000-0001-5224-1824

Duygu Perçin Renders, Kütahya Sağlık Bilimleri
Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Kütahya
0000-0002-4436-5226

İmran Sağlık, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa
0000-0003-0864-4989

Hafize Sav, Kayseri Şehir Hastanesi,
Mikrobiyoloji Bölümü, Kayseri
0000-0001-8435-396X

Fatih Şahiner, Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Ankara
0000-0002-3488-0339

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

Necla Tülek, Atılım Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Ankara
0000-0002-3952-4982

Hrisi Bahar Tokman, İstanbul Üniversitesi-
Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul
0000-0002-2205-5120



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

DERLEMELER / REVIEWS

- **İnsan Mikrobiyomunun Karanlık Kutusu: Mikrobiyota ve Virom**
The Dark Matter of Human Microbiota: Virobiota and Virome
Gülendam BOZDAYI, Işıl FIDAN 89-98
- **COVID-19 Pandemisinde Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri**
Microbiological Diagnostic Methods in COVID-19 Pandemic
Aybala TEMEL, Ayşegül ATEŞ, Bayrı ERAÇ 99-108

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS

- **Agarda Dilüsyon ve Deneme Aşamasındaki EUCAST Disk Difüzyon Yöntemi ile Saptanan *Bacteroides fragilis* Grubu İzolatlarına Ait Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması**
Comparison of the Antimicrobial Susceptibility Results of Bacteroides fragilis Group Isolates Determined by Agar Dilution and the Tentative EUCAST Disk Diffusion Method
Semra EMİNOĞLU, Bermal TEKEŞ, Elvan SAYIN, Nurver ÜLGER TOPRAK 109-118
- **HIV Pozitif Kişilerde Cinsel Yolla Bulaşan Etkenlerin Sıklığı**
Frequency of Sexually Transmitted Pathogens in HIV- Positive Individuals
Tuğba BOZDEMİR, Candan ÇİÇEK, Deniz GÖKENGİN, Sabire Şöhret AYDEMİR, İmre ALTUĞLU, Uğur ÖNAL, Timur KÖSE, Hüsnü PULLUKÇU 119-125
- **Fetal Anomali ve Hidrops Fetalis Tanısı Almış Gebelerde Real Time PCR Yöntemi ile Human Parvovirüs B19 Pozitifliğinin Araştırılması**
Investigation of Human Parvovirus B19 Positivity by Real-Time PCR Method in Pregnant Women with Fetal Anomaly and Hydrops Fetalis
Meryem ÇOLAK, Aylin ALTAY KOÇAK, Deniz KARÇAALTINCABA, Işıl FİDAN, Gülendam BOZDAYI 126-131
- **Van İli Sınırları İçerisinde Van ve Erçek Gölü'nün Mikrobiyolojik Kirlilik Seviyesinin Belirlenmesi**
Determination of Microbiological Pollution Level of Lake Van and Lake Erçek Situated within the Borders of Van Province
Elif AYDIN, Mehmet PARLAK, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU, Yasemin BAYRAM 132-142

- **Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Vankomisine Direçli Enterokok (VRE) Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Değerlendirilmesi**
Phenotypic and Genotypic Evaluation of Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) Strains Isolated from Various Clinical Specimens
 Semra BİLEN, Mehmet PARLAK, Yusuf YAKUPOĞULLAR, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU,
 Yasemin BAYRAM, Cennet RAĞBETLİ, Arzu UYANIK PARLAK, Şevin İRDEN **143-149**
- **Kandidemi Etkenlerinin Tür Dağılımı ve Duyarlılıkları: Hastanemizde Ampirik Antifungal Tedavi Politikası Değiştirilmeli mi?**
Distribution and Susceptibilities of Pathogens causing Candidemia: Should Empirical Antifungal Treatment Policy Be Changed in Our Hospital?
 Halil ER, Nisel ÖZKALAY YILMAZ, Yeşer KARACA DERİCİ, Sevgi HANCI,
 Şükran Saba ÇOPUR **150-155**
- **Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'dan Elde Edilen Fajın Karakterizasyonu**
Characterization of Phage Obtained from Methicillin -Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)-
 Özlem ULUSAN BAĞCI, Fikret ŞAHİN, Mehmet KIYAN **156-162**
- **Gram Negatif Bakterilerin ve Steril Süpernatantlarının *Candida albicans* Biyofilmi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması**
Comparison of the Effects of Gram-Negative Bacteria and Their Sterile Supernatants on Candida albicans Biofilm
 Mayram HACIOĞLU, Özlem OYARDI **163-171**
- **Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının İlk Sıra Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıkları**
Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates to First-line Antituberculosis Drugs at Dokuz Eylül University Hospital
 Nazlı ARSLAN, Müge Hacer ÖZKARATAŞ, Nuran ESEN, Aydan ÖZKÜTÜK **172-179**
- **Çanakkale'de Tonsillofarenjitli Hastaların Boğaz Kültürlerinden İzole Edilen Beta Hemolitik Streptokokların Grup Dağılımlarının ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi**
Determination of Group Distributions and Antibiotic Resistance Profiles of Beta- Hemolytic Streptococci Isolated from Throat Cultures of Patients with Tonsillopharyngitis in Canakkale Province
 Mehizat ALTUN, Binnur MERİÇLİ YAPICI **180-188**
- YAZARLARA BİLGİ **VII-VIII**

İnsan Mikrobiyomunun Karanlık Kutusu: Virobiyota ve Virom

The Dark Matter of Human Microbiota: Virobiota and Virome

Gülendam Bozdayı[®], Işıl Fidan[®]

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

Atf/Cite as: Bozdayı G, Fidan I. İnsan mikrobiyomunun karanlık kutusu: Virobiyota ve virom, Türk Mikrobiyol Cemiyet Derg. 2021;51(2):89-98.

Öz

İnsan mikrobiyomunun viral komponenti "virobiyota" olarak tanımlanır. Virobiyota, insanda bulunan virüslerin toplamını gösterir. Virobiyotadaki tüm genler "virom" olarak tanımlanır. İnsan viromu, ökaryotik hücreleri enfekte eden virüsler, prokaryotik hücreleri enfekte eden bakteriyofajlar ve endojen retrovirüsler gibi insan genomunda bulunan virüsten türemiş genetik elementlerden oluşur. "High-throughput sequencing" gibi yeni sekanslama teknolojilerinin geliştirilmesi, insan genomunun analizine olanak sağlamıştır. Yeni nesil sekanslama yöntemi ile pek çok yeni virüs bulunmuştur. Son yıllarda, hastalıklarda virom değişikliklerinin gözlenmesi, insan virom çalışmalarında bir artışa neden olmuştur. İnsan viromundaki değişiklikler; enfeksiyon, inflamatuvar hastalıklar, kanser ve otoimmünite ile ilişkili olabilir. Viromun insan sağlığını ve hastalığını nasıl etkilediğinin anlaşılması, virom üyelerini hedefleyen potansiyel terapötik yaklaşımların geliştirilmesini sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Virobiyota, virom, hastalık

ABSTRACT

The viral component of the human microbiome is referred as 'virobiota'. The virobiota is the sum of all viruses found in or on humans. The set of all genes of virobiota is referred as 'virome'. The human virome consists of virus-derived genetic elements found in human genome constituted of viruses that infect eukaryotic cells, bacteriophages, prokaryotic cells, and, endogenous retroviruses. The development of new sequencing technologies, such as high-throughput sequencing techniques allowed the analysis of the human virome. Many new viruses have been discovered lately, using new generation sequencing technology. In recent years, there has been an increase in the studies of the human virome as changes in virome have been observed in diseases. The alterations in the human virome may be associated with infectious, inflammatory diseases, cancer and autoimmunity. The understanding of how the virome affects human health and disease can provide the development of potential therapeutic approaches that target the members of the virome.

Keywords: Virobiota, virome, disease

Alındığı tarih / Received:
07.05.2020 / 07.May.2020

Kabul tarihi / Accepted:
22.08.2020 / 22.August.2020

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

G. Bozdayı 0000-0002-6036-6819
I. Fidan 0000-0001-6296-5017

✉ isilfidan@yahoo.com

GİRİŞ

İnsan mikrobiyomu, homeostazisi sürdürmek için birbirleriyle ve konakla aktif etkileşime giren; komensal, simbiyotik ve patojenik bakteriler, virüsler, arkealar ve küçük ökaryot topluluklarından oluşmuştur⁽¹⁾. Mikrobiyom çalışmaları günümüze kadar esas olarak insan mikrobiyomunun bakteriyel komponenti üzerine yoğunlaşmıştır. Bu konuda, bakteri topluluklarının izolasyon ve tanımlamasında kul-

lanılan tekniklerin daha iyi tanımlanmış ve standardize edilmiş olmasının ve bakterilerde filogenetik olarak korunmuş 16S ribozomal RNA (rRNA) gen bölgesinin kullanılmasının katkısı büyüktür⁽¹⁾. İnsan fungal (mikrobiyota), viral (virobiyota) ve arkeal (arkeobiyota) mikrobiyota ile ilgili araştırmalar henüz emekleme döneminde⁽²⁾. Konakta bulunan tüm virüs topluluğu "virobiyota" ve virobiyotadaki tüm gen kümesi "virom (viral metagenom)" olarak tanımlanmasına rağmen, bu terimler genellikle birbirlerinin

yerine kullanılmaktadır. Virüsler; genetik olarak DNA veya RNA içerdiğinden, bakterilerde kullanılan 16S rRNA ve mantarlarda kullanılan internal transcribed spacer (ITS) bölgesi gibi tek bir korunmuş dizi taşıdığından, insan virobiyotasının analizi gerilerde kalmış ve viral metagenom "viral karanlık alan" olarak belirtilmiştir⁽³⁾. Viral metagenomik çalışmalardan elde edilen sekansların yaklaşık %60-99'ı tanımlanamamış, sınıflandırılmamış veya fonksiyonel tanımlanması yapılmamış durumdadır⁽⁴⁾. Moleküler tanı yöntemlerinin ve özellikle yeni nesil sekanslama yöntemlerinin gelişimi, insan viromunun aydınlatılmasına olanak sağlamıştır⁽⁵⁾.

Virom, dünyada en çok bulunan ve en hızlı mutasyon gözlemlenen genetik elementleri içerir. İnsan viromu, bireyler arasında çeşitlilik gösterirken, her bireyin, kendine özgü ve nispeten değişmeyen bir viroma sahip olduğu belirlenmiştir⁽⁴⁾. Aslında virom; yediklerimiz, nasıl yaşadığımız, nerede yaşadığımız, ne yaptığımız, genetik yapımız ve diğer belirlenememiş faktörlerin yansımasıdır⁽⁶⁾. Viromun; konağın yaşına, immün durumuna ve ekzojen virüslerle karşılaşmaya bağlı olarak bireyler arasında veya aynı bireyde zamanla değişiklikler göstermesi olasıdır⁽⁷⁾.

İnsan viromu aşağıdaki komponentlerden oluşur⁽¹⁾:

1. Endojen viral elementler (Endojen retrovirüsler)
2. Ökaryotik virom (Ökaryotik hücreleri enfekte eden virüsler)
3. Prokaryotik virom (Bakteriyofaj)

İnsan Endojen Retrovirüsler (Human Endogenous Retrovirus, HERV)

İnsan kromozomunda bulunan "fosil virüs" olarak da tanımlanabilecek endojen retrovirüsler, insan genomunun yaklaşık %8'ini oluşturan ve genoma entegre olan retroviral gen kalıntılarıdır^(1,5). HERV, genellikle defektiftir ve HERV transkripsiyonu sonucu enfeksiyöz virüs partikülleri oluşmaz ama HERV transkripsiyonu fonksiyonel proteinlerin oluşumuna neden olabilir. Pek çok HERV'nin zararsız olduğu düşünülse de otoimmün hastalıkların (multipl sklerozis (MS), tip1 diabetes mellitus, romatoid artrit), nörodejeneratif bozuklukların (Amyotrophic lateral sclerosis=ALS), kronik inflamasyonun, HIV enfeksiyonu ve kanserin

belli HERV'ler ile bağlantılı olabileceği ve bu tabloların HERV replikasyonunu uyarabileceği ileri sürülmüştür. Bu tablolarda, plazmada HERV transkripsiyonu ve RNA düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir^(1,5). Herpes virüslerin, MS'de patojenik etkiye neden olan HERV-W ifadenmesini aktive ettiği düşünülmektedir⁽⁸⁾. ALS hastalarının nöronlarında HERV-K ifadenmesi, nörodejenerasyona yol açabilir⁽⁹⁾. HERV'lerin doğal immün yanıtta rol oynayan pek çok patern tanıyıcı molekülü aktive ederek otoimmüniteyi tetiklediği ve otoimmün hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir⁽¹⁰⁾. Melanoma, meme, böbrek ve over kanserleri gibi çeşitli kanser türlerinde HERV proteinleri ifadenmesindeki artış, endojen retrovirüslerin potansiyel onkojenik etkileri ihtimalini akla getirmektedir⁽¹¹⁾. Bu hastalıklarda HERV etiolojisinin gösterilmesi, HERV genlerini hedefleyen hücresel aşı ve immünomodulator terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Ökaryotik Virüsler

İnsan hücrelerini, küçük ökaryotları (protozoan, fungi), bitki ve hayvanları enfekte edebilen ökaryotik virüsler de insan genomunun bir parçasıdır⁽¹⁾. Ökaryotik virüsler, insan bağırsak viromunun küçük bir bölümünü oluşturur⁽¹²⁾. Sağlıklı insan viromunda sıklıkla saptanan virüsler; tek sarmallı DNA virüsleri olan Anellovirüs ve Circovirüs türlerini ve çift sarmallı DNA virüsleri olan Adenovirüs, Polyomavirüs ve Papillomavirüs türlerini içerir (Tablo 1)^(4,5,7). Ökaryotik virüslerin bazıları, kommensal bakterilere benzer şekilde mukozal immüniteyi etkileyip, intestinal homeostazisi sağlayabilir⁽¹³⁾. İnsan ökaryotik viromu, semptomatik hastalıklara neden olabilir veya sağlıklı kişilerde uzun süre latent olarak kalır, hatta yararlı etkiler oluşturabilir⁽¹⁴⁾. Dizileme teknikleri ile ökaryotik virüslerin mevcut ve yeni suşlarının tanımlanmasıyla, etiolojisi bilinen veya bilinmeyen hastalıklarda yeni ökaryotik virüslerin keşfi sağlanabilmektedir⁽¹⁾.

Ökaryotik virüsler, yaşamın erken dönemlerinde bağırsak mukozasına kolonize olmaya başlarlar. İnsan intestinal viromunda, hem RNA hem de DNA ökaryotik virüs popülasyonları ve çeşitliliği yaşla artış gösterir. *Phycodnaviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*,

Tablo 1. İnsan viromu; Sağlıklı bireylerden sıklıkla izole edilen virüsler^(7,15).

Virom	Genom	Virüs Ailesi	Örnek
Deri	DNA	<i>Anelloviridae</i>	Torque teno virüs (TT, TTV)
		<i>Circoviridae</i>	Gyrovirüs
		<i>Herpesviridae</i>	HHV7
		<i>Papillomaviridae</i>	Betapapillomavirüs (tip 5, 9, 49) Gamapapillomavirüs (tip 4, 48, 50, 60, 88)
		<i>Parvoviridae</i>	Parvovirüs B19
		<i>Polyomaviridae</i>	Merkel hücreli polyoma virüs (MCPyV), HPyV6, HPyV7, HPyV9
		<i>Poxviridae</i>	Vaccinia virüs
Solunum Sistemi	DNA	<i>Adenoviridae</i>	Adenovirüs türleri
		<i>Anelloviridae</i>	TTV
		<i>Herpesviridae</i>	HSV1
		<i>Papillomaviridae</i>	HPV11
		<i>Polyomaviridae</i>	KIPyV
	RNA	<i>Parvoviridae</i>	Bocavirüs
		<i>Coronaviridae</i>	Coronavirüs OC43
		<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza virüs
		<i>Pneumoviridae</i>	RSV
		<i>Picornaviridae</i>	Rhinovirüs
Gastrointestinal Sistem	DNA	<i>Adenoviridae</i>	Adenovirüs grup C ve F
		<i>Anelloviridae</i>	TT, TT mini virüs, TT midi virüs
		<i>Circoviridae</i>	İnsan gyrovirüs
		<i>Herpesviridae</i>	CMV
		<i>Papillomaviridae</i>	HPV6
	RNA	<i>Polyomaviridae</i>	BK virüs
		<i>Caliciviridae</i>	Norovirüs
		<i>Reoviridae</i>	Rotavirüs
		<i>Picornaviridae</i>	Enterovirüs, Parechovirüs, Aichivirüs
		<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirüs
<i>Astroviridae</i>	Astrovirüs		
Genital Sistem	DNA	<i>Adenoviridae</i>	Adenovirüs türleri
		<i>Anelloviridae</i>	TTV
		<i>Herpesviridae</i>	HSV2
		<i>Papillomaviridae</i>	HPV16
		<i>Polyomaviridae</i>	BK virüs
Sistemik	DNA	<i>Adenoviridae</i>	Adenovirüs türleri
		<i>Anelloviridae</i>	TTV, TT-like mini virüs
		<i>Herpesviridae</i>	Nöronlarda HSV, VZV; dolaşımdaki lenfositlerde CMV, EBV, HHV6, HHV7
		<i>Parvoviridae</i>	Parvovirüs B19
	RNA	<i>Polyomaviridae</i>	BK virüs
		<i>Bornaviridae</i>	Bornavirüs
		<i>Flaviviridae</i>	GB virüs C
		<i>Retroviridae</i>	Endojen retrovirüsler

Mimiviridae ve *Iridoviridae* ailelerini içeren pek çok ökaryotik virüs, bebek dışkı örneklerinde tanımlanmıştır⁽¹⁾. Picornavirüs ve Anellovirüs, sağlıklı çocukların dışkılarında en fazla bulunan ökaryotik virüslerdir⁽¹²⁾. İkiz bebeklerde ökaryotik virom, diğer bebeklerle kıyaslandığında çok daha fazla benzerlik gösterir. Anne sütü ile bebeğin dışkısında benzer virüsler saptandığından anneden bebeğe direkt geçiş olduğu düşünülmektedir⁽¹⁶⁾. Anellovirüs, anne sütü alan bebeklerde 3 aydan önce ender görülürken, bebeğin immün yanıtının gelişmeye başladığı 6.-12. aylarda pik yapar.

Anellovirüs (AV); bilinen bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş, yaşamın erken dönemlerinde vücutta persistan enfeksiyon oluşturan zarfsız, sirküler, negatif polariteli ssDNA içeren virüslerdir⁽⁵⁾. Anellovirüs, neredeyse tüm memelileri enfekte eder, persiste kalır ve insan viromunun büyük kısmını oluşturur. Konakta belirgin hasar oluşturmada sürekli çoğaldığı için kommensal virüslere en iyi örnektir⁽⁶⁾. Transfüzyonla ilişkili hepatit çalışmaları sırasında keşfedilmiştir. Ancak, farklı cinslerinin insanların ve birçok hayvan türünün %90'ından fazlasını enfekte ettiği ve plazma, tükürük ve dışkıda bulunduğu

belirlenmiştir⁽⁷⁾. Anellovirüs prototipleri; Torque teno virüs (TTV), Torque teno mini virüs, Torque teno midi virüstür. İmmünesupresif bireylerde ve inflamatuvar hastalığı bulunan kişilerde, AV viremi düzeylerinde artış saptanması nedeniyle, sağlıklı bireylerde immünolojik kontrol altında tutulduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, Anellovirüsün inflamatuvar olayları ve immün sistemin yeterliliğini takip etmede kullanışlı ve yararlı bir moleküler belirteç olarak kullanılabilceği düşünülmektedir⁽⁶⁾.

Circovirüs (CV); Küçük, sirküler virüslerdir ve negatif polariteli ssDNA genomu içerirler. CV, memelileri enfekte eden en küçük DNA virüsüdür. Kümes hayvanları ve domuzlarda sıklıkla bulunduğu insan gastrointestinal sisteminde bulunmasının gıda alımından kaynaklanabileceği düşünülmektedir⁽⁵⁾. 1979'da keşfedilen Chicken anemia virüs (CAV), *Circoviridae* ailesinin Gyrovirüs cinsinin bilinen ilk türüdür ve oluşturduğu hastalık gaga ve tüy hastalığı (beak and feather disease=BFDV) olarak isimlendirilmiştir. İlk insan CV 2011'de insan deri sürüntü örneklerinde yeni nesil dizileme tekniği ile belirlenmiş ve CAV ile benzerliğinden dolayı insan Gyrovirüs (HGyV) olarak isimlendirilmiştir⁽¹⁷⁾. Daha sonra, insan dışkı-sında üç insan gyrovirüsü tanımlanmıştır⁽⁷⁾. Hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Bu virüslerin insan veya tavuk orijinli olup olmadığı kesin değildir.

Picobirnavirüs; 2 lineer dsRNA segmenti içeren genomu sahip zarfsız bir virüstür. Farklı suşları, insanlarda, memelilerde, kuş ve sürüngenlerde yaygın olarak bulunur. İmmünyetmezlikli kişilerde ve çocuklarda diyare ile ilişkilidir⁽⁷⁾.

Adenovirüs; ateşli çocuklarda sıklıkla solunum yolu virüsü olarak saptanır. Sağlıklı kişilerin burun ve üst solunum yollarında da bulunabilmektedir. Benzer şekilde, **Polyomavirüs**lar sağlıklı kişilerde sıklıkla bulunurken, immünyetmezlikli kişilerde üriner sistem enfeksiyonuna (BK virüs) ve lökoensefalopatiye (JC virüs) neden olabilen türleri de vardır. **Papillomavirüs,** deri ve mukozal epitelde replike olan, zarfsız çift sarmallı DNA virüsleridir. İnsan viromunda, özellikle deri ve tükürük örneklerinde farklı papillomavirüsler bulunur. Çoğu papillomavirüs

enfeksiyonu asemptomatiktir, ancak insan papillomavirüs persistan enfeksiyonlara neden olabilir. Deride siğillere ve servikal kansere yol açabilecek premalign lezyonlara yol açabilir.

İnsan viromunda ayrıca, bitkileri enfekte eden, çevre ve gıda aracılığıyla alınan bitki virüsleri de bulunur. **Pepper mild mottle virüs (PMMoV),** biber virüsüdür ve olasılıkla gıdalarla alınıp, insan gastrointestinal sistemine geçmektedir. Virüsün, biberli gıdalar ve belli bitkisel ürünlere duyarlı kişilerde semptomların ortaya çıkmasına neden olabilen inflamasyonu tetikleyebileceği düşünülmektedir⁽⁵⁾. Tobacco mosaic virüs, panicum mosaic virüs, oat chlorotic stuntvirüs, oat blue dwarf virüs, maize chlorotic mottle virüs ve grapevine asteroid mosaic-associated virüs de insanlarda bulunabilen diğer bitki virüsleridir⁽¹²⁾.

Prokaryotik Virom (Bakteriyofajlar=Fajlar)

İnsan viromunun major bileşeni, bakteriye spesifik virüsler olan bakteriyofajlardır. Fajlar, doğal ekosistemlerdeki bakteri popülasyonlarının etkin düzenleyicileridir ve insan vücudu bu virüsler için önemli bir rezervuardır⁽¹⁸⁾. Fajlar, ilk olarak 20. yüzyılda dışkıdan izole edildikten sonra deri, oral kavite, idrar, solunum yolu, sindirim sistemini de içeren insan vücudunun birçok biyomunda saptanmıştır. Akciğer ve bağırsak mukozasında bakterilerden yaklaşık olarak 20 kat daha fazla bakteriyofaj bulunduğu tahmin edilmektedir⁽⁵⁾. Kalın bağırsak, bu tür virüsler için uygun bir ortamdır ve dışkının her gramında yaklaşık 10^{8-9} virüs partikülü bulunur⁽¹⁾. İnsan bağırsağında yaklaşık 10^{15} kopya bakteriyofaj vardır⁽¹⁹⁾. Ökaryotik RNA ve DNA virüslerinden farklı olarak, intestinal bakteriyofaj yoğunluğu ve çeşitliliği doğumda pik yaparken, yaşla birlikte azalır⁽⁹⁾.

İnsan bağırsak viromu çoğunlukla DNA bakteriyofajlarını içerir. Bağırsakta, fajların çoğu bakteriyel konaklarına integre olarak profaj olarak bulunur ve konak genomlarının %20'sini oluşturabilir, yani insan bağırsak ekosisteminde ılımlı fajlar, litik fajlara göre daha baskın olarak bulunur^(20,21). Bu virüslerin çoğunun, transdüksiyon ve lizojeni ile antibiyotik direncini ve metabolizma için gerekli enzimleri kodlayan genleri aktararak bakteri hücrelerine yararlı etkiler sağladığı

düşünülmektedir. Bağırsak bakteriyofajlarından konaklarına genetik transfer, olasılıkla bağırsak mikrobiyotasının değişen besin koşullarına adaptasyonu-na ve antibiyotik tedavisinin etkilerinden korunmasına yardım eder.

Bağırsak bakteriyofajları genellikle çift ve tek sarmallı DNA fajlarından oluşur. En çok bulunan bakteriyofajlar; *Microviridae* ailesinde yer alan tek sarmallı DNA virüsleri ve *Caudovirales* takımında yer alan çift sarmallı DNA virüsleridir^(2,12). *Caudovirales* takımında *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* ailesi yer almaktadır^(4,20). İnsan bağırsak viromunda en fazla bulunan virüs olan CrAssphage (Cross-Assembled phage) DNA fajı, 2014 yılında tanımlanmıştır. CrAssphage ve yeni crAss-like fajlar, *Bacteroides* türü bakteriler ile ilişkilidir ve olasılıkla *Caudovirales* ailesi içinde yer alacaktır^(20,22,23) (Şekil 1).

Doğumda düşük intestinal bakteri sayısı ve yüksek bakteriyofaj yoğunluğu vardır. *Caudovirales* ve *Microviridae* bakteriyofaj gruplarının miktarı ters korelasyon gösterir ve 2 yaşına kadar *Microviridae* ailesi daha baskın olarak bulunur. En sık görülen intestinal bakteriyofaj olan CrAssphage ise ileri yaşlarda pik yapar⁽¹³⁾.







İnsan genomundaki bakteriyofajlar, özellikle yoğun olarak buldukları mukozal yüzeylerdeki patojenlere karşı savunmanın ilk basamağını da oluşturabilir. Konak mukozasını bakteriyel enfeksiyonlardan korumada, "Bakteriyofajın mukozaya adere olma"

modeli tanımlanmıştır. Bakteriyofajların Ig benzeri protein domainleri aracılığıyla münin glikoproteinleri ile etkileşerek mukozaya bağlanması ve gömülmesi nedeniyle, bakteriyel patojenlere karşı konak kaynaklı olmayan immüniteyi sağladığı düşünülebilir⁽²⁴⁻²⁶⁾. Bakteriyofajlar bakteri miktarı ve kolonizasyonunu etkileyebildiklerinden, bakteriyofaj sayısı ve çeşitliliğindeki değişiklikler sağlıksız bir flora oluşturup disbiyozise neden olarak, intestinal homeostazisi bozacak etkiler oluşturabilir⁽¹³⁾.

Bağırsak Viromu

Bağırsak viromunun, bakteriyomla ve hatta direkt insan immün sistem bileşenleri ile etkileşime girerek homeostatik regülasyon ve hastalık gelişiminde önemli rol oynadığının düşünülmesi nedeniyle, bağırsak viromunu ayrı bir başlık altında incelemek yararlı olacaktır.

Bakteriyofajlar, bağırsak viromunun yaklaşık %90'ını oluşturan ana bileşendir. Bağırsak viromunda; ökaryotik DNA virüsleri olarak Anellovirüs; ökaryotik RNA virüsleri olarak ise Enterovirüs, Parechovirüs, Tombamovirüs ve Sapovirüs türleri sık vardır⁽¹³⁾. Bağırsak viromunun erken yaşlarda kazanılması ve anne sütünde bulunan bazı viral komponentleri içermesi nedeniyle, bağırsak viromunun beslenme alışkanlığını yansıttığı söylenebilir. İnsan sütü virüsleri, infant bağırsak viromunun şekillenmesinde rol oynar. Emzirme ile bebeğe virom geçişi, immün sistem gelişimi için kritik noktalardan biri olabilir⁽²⁷⁾. Aynı

Çift sarmallı DNA fajları (dsDNA)	<i>Myoviridae</i> 	<i>Siphoviridae</i> 	<i>Podoviridae</i> 	<i>CrAssphage</i> 
Tek sarmallı DNA fajları (ssDNA)	<i>Inoviridae</i> 	<i>Microviridae</i> 		

Şekil 1. Bağırsak bakteriyofajları (Kaynak 20'den uyarlanmıştır.)

diyeti uygulayan erişkinlerde benzer bağırsak virom komponentlerinin olduğu belirlenmiştir⁽²⁸⁾. İnsan sağlığında önemli olan fermente gıdaların ve süt ürünlerinin endojen viromu etkileyebilecek spesifik virüsler içerdiğinin belirlenmesi (*Leuconostoc*, *Weissella*, *Listonella*, *Escherichia* ve *Staphylococcus* türlerini enfekte eden fajlar) diyetin virom içeriğindeki önemini desteklemektedir⁽²⁸⁾.

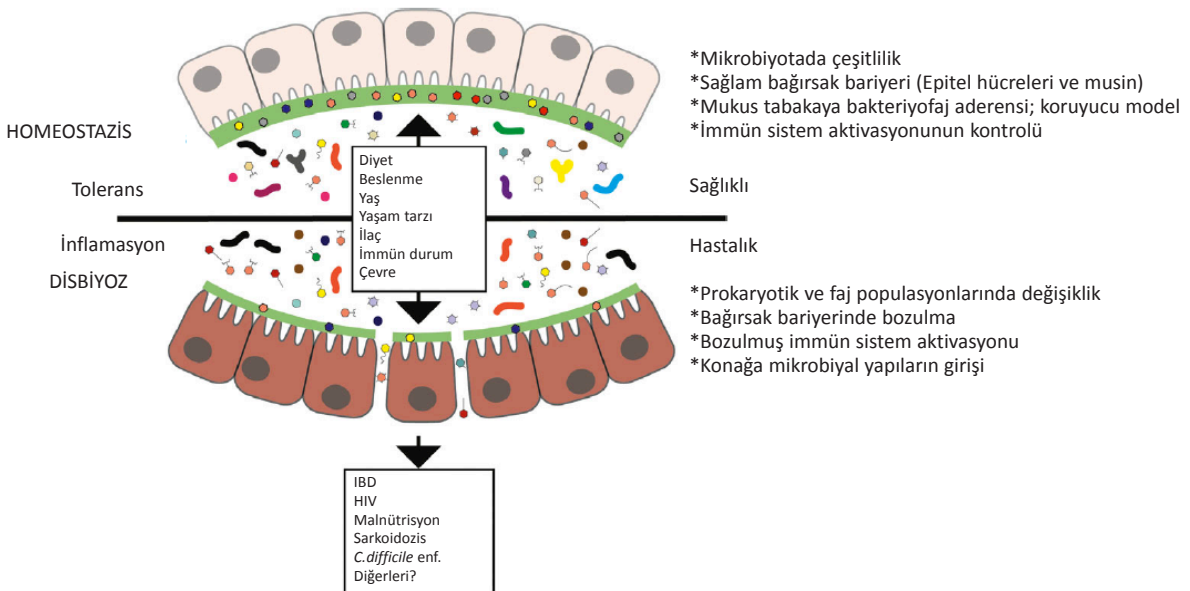
Bağırsak mikrobiyotasının viral üyelerinin, insanda bazı yararlı etkiler oluşturduğunun gösterilmesi, virüslerin insan bağırsak mikrobiyotası için gerekli bir komponent olduğu düşüncesini güçlendirmektedir⁽¹²⁾. Antibiyotik uygulanmış farelerde persistan Norovirüs enfeksiyonunun intestinal morfoloji ve fonksiyonu düzelttiğinin gösterilmesi, ökaryotik virüslerin bağırsakta yararlı etkiler yapan kommensal bakteriler gibi etki gösterebildiğini düşündürmüştür⁽⁴⁾.

Bağırsak viromuna ait yapılar, kommensal bakterilerle ve bağırsak bariyeri ile etkileşime girerek, bağırsak sağlığı için gerekli olan fonksiyonlara katkı sağlar. Bağırsak viromunun; metabolik yollar, immün regülasyon, toksik maddelerin ve besinlerin metabolizması, bağırsak bariyerinin sağlanması, bağırsak motilitesinin regülasyonu gibi fonksiyonları vardır⁽¹²⁾. Sağlıklı bağırsak viromu (özellikle bakteriyofajom),

bağırsak mikrobiyomunun yapı ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde ve insan sağlığında önemli rol oynamaktadır. Virom üyeleri, mikrobiyal dengesizlik olarak tanımlanan disbiyozu neden olarak bazı hastalıkların patogeneğinde rol oynuyor olabilir. Viromla ilişkili belli hastalıklar, çeşitlilikte değişiklik ve spesifik virotiplerin baskınlığı (Örneğin, inflamatuvar bağırsak hastalığında Caudovirales) ile karakterizedir. Çeşitlilikte azalma ve bağırsak bariyer fonksiyonunda değişiklik ile karakterize intestinal virom değişiklikleri; enfeksiyöz, otoimmün hastalıklar, metabolik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıklarda ilişkilidir (Şekil 2)⁽²⁴⁾.

Viromun Hastalık Tablolarıyla İlişkisi

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH): Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) gibi İBH'da mikrobiyal etiolojinin belirlenmesi, hastalıklarda biyobelirteç ve terapötik hedef olarak kullanımları açısından önemlidir⁽¹⁾. İBH'de enterik viromda hastalığa spesifik değişiklikler gözlenmiştir. Ökaryotik virüslerin ve bakteriyofajların, bakteriyel mikrobiyom ile etkileşerek intestinal inflamasyona ve bakteriyel disbiyozu neden olduğu düşünülmektedir⁽²⁹⁾. İBD'de *Microviridae* bakteriyofajlarının sayısı ve çeşitliliğinde bir artış gözlenmezken, en önemli değişiklik *Caudovirales* bakteriyofajların anlamlı düzeylerde zenginliğidir. CH'ında bak-



Şekil 2. İnsan bağırsak viromunun sağlık ve hastalığındaki etkileri (Kaynak 20'den uyarlanmıştır.)

terifajların aşırı artışının bakteri çeşitliliğindeki azalma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. CH bulunan çocuklarda *Caudovirales* fajları, ÜK'li çocuklardan daha fazla bulunmuştur. *Microviridae* faj ailesi CH bulunan çocukların dışkı örneklerinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeylerde düşük olarak saptanmıştır⁽³⁰⁾. *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* fajları ÜK'li hastaların rektal mukoza örneklerinde daha yoğun olarak belirlenmiştir⁽³¹⁾. CH ve ÜK hastalarındaki virom değişikliklerinin hastalığa spesifik olduğu belirtilmiştir⁽²⁹⁾. Fajlara benzer şekilde, ökaryotik viromdaki disbiyoz da IBD patogenezini ile ilişkilidir. ÜK'li hastalarda kontrol grubuna göre *Pneumoviridae* ailesinin daha fazla olduğu, *Anelloviridae* ailesinin ise daha az bulunduğu belirlenmiştir⁽³¹⁾. ÜK'in mukoza virobiyotasında değişikliklerle karakterize olduğu ve ÜK patogenezinde mukozal viromun önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir^(2,31).

Tip-1 Diabetes Mellitus (DM): Hayvan deneylerinde *Coxsackie B4* gibi viral etkenlerin langerhans pankreas adacık hücrelerinde hasar oluşturabileceğinin gösterilmesi, tip-1 DM ile virüs birlikteliğini düşündürmüştür. İntestinal viromun, tip-1 DM gelişimindeki rolüne ilişkin az sayıda çalışma vardır. Guoyan ve ark.⁽³²⁾ serumlarında tip-1 DM ile ilişkili otoantikor bulunan 11 çocuğun dışkı örneklerini kontrol grubu ile karşılaştırdığında; kontrol grubu örneklerinde ökaryotik virüslerden *Circoviridae* ile ilişkili sekansların sıklığı ve çeşitliliğinin anlamlı düzeylerde fazla olduğunu belirlemişlerdir. Bakteriyofajlar açısından kontrollerde çeşitlilik ve miktarın, tip-1 DM'li çocuklara göre daha fazla olduğu saptanmıştır. *Mycoviridae* ve *Podoviridae* fajlarının tip-1 DM'li çocuklarda azaldığı, tip-1 DM olmayan çocuklarda artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir.

Tip-2 Diabetes Mellitus: Son yıllarda, tip-2 DM'un mikrobiyom yapısındaki değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bağırsak viromu tip-2 DM, obezite ve ilişkili hastalıklarda önemli rol oynuyor olabilir⁽³³⁾. Tip-2 DM hastalarında bağırsak faj sayısında anlamlı artış belirlenmiş ve bağırsak viromunda anlamlı değişikliklerin olduğu gözlenmiştir⁽²⁶⁾. Tip-2 DM'li kişilerde; *Escherichia* ve *Clostridium* türü bakterileri enfekte eden *Podoviridae* ailesine ait fajlarla; *Lactobacillus*,

Pseudomonas, *Staphylococcus* türü bakterileri enfekte eden *Siphoviridae* ailesine ait fajların arttığı gözlenmiştir⁽⁴⁾. Zayıf fenotipli farelerden obez fenotipli farelere fekal virom transplantasyonunun, obez farelerde kilo kaybına ve tip-2 DM semptomlarını azaltarak kan glukoz düzeylerinde normalleşmeye neden olduğu ve fekal viromun bu etkiyi gastrik mikrobiyotayı değiştirerek gerçekleştirdiği düşünülmüştür⁽³³⁾. Fajların tip-2 DM ve obezite ile ilişkisinin gösterilmesi, faj aracılı tanı ve tedavi yaklaşımlarına ışık tutacaktır.

HIV enfeksiyonu: HIV enfeksiyonu sırasında inflamasyon ve diyare tablolarının görülmesi, bağırsak mikrobiyom disbiyozisinin HIV enfeksiyonu ile ilişkisi olabileceğini düşündürmüştür⁽⁴⁾. Progresif HIV enfeksiyonundaki immünyetmezlik tablosu; enterik virom ve bakteriyel mikrobiyomdaki değişikliklerle birliktedir ve bu durum, AIDS ile ilişkili enteropati ve hastalık ilerlemesi ile ilişkili olabilir⁽³⁴⁾. *Adenoviridae* sekanslarının, CD4+ T hücre sayısı 200'ün altında olan HIV pozitif kişilerde, 200 üstü ve HIV negatif kişilere göre anlamlı düzeylerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. HIV pozitif kişilerde düşük periferik CD4+T hücre sayısı enterik Adenovirüs sekansındaki genişleme ile ilişkilidir. HIV pozitif kişilerde, düşük CD4+T hücre sayısı varlığında gözlenen artmış Anellovirüs düzeyleri, bu virüsün replikasyonu üzerine immünolojik kontrolün azalması nedeniyle olabilir. HIV pozitif hastalarda, kanda viral yükü yüksek olan immünsupresif kişilerde, AIDS tablosu gelişenlerde Anellovirüs daha yüksek oranlarda belirlendiği için konak immün yanıtıyla Anellovirüs yoğunluğu arasında ters ilişki olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, Anellovirüs viral yükünün tespitinin, immünosupresif ve HIV pozitif hastalarda immünolojik yanıtın takibinde kullanılabilecek bir belirteç olabileceği düşünülmektedir⁽³⁴⁻³⁶⁾. HIV/HPV koenfekte kadınların servikal sürüntü örneklerinin virom analizinde; *Papillomaviridae*, *Anelloviridae*, *Genomoviridae* ve *Herpesviridae* ailelerinde yer alan virüs türlerinin varlığı belirlenmiştir. Premalign servikal lezyonlu kadınlarda papillomavirüs çok daha fazla oranda tespit edilmiştir⁽³⁵⁾.

Kanser: Viromun, karsinogenez ve kanser progresyonu üzerine önceden sanılandan çok daha fazla rolü

olduğu düşünülmektedir. Geçici veya kalıcı olarak virom komponenti olan çok sayıda virüs, enfeksiyon oluşturarak direkt ve indirekt yolla karsinogenezi indükleyebilir. Kommensal olmayan DNA ve RNA virüslerinin bazıları (EBV, HBV, HCV, HIV-1, HHV-8, HPV, HTLV-1) onkogeniktir ve sınıf 1 karsinojen olarak sınıflandırılır. Bazı türleri hayvanlarda kanserle ilişkili olan (Simian Virüs 40; SV40) ve insanlarda da kanserle ilişkili olduğu düşünülen türleri bulunan (Merkel cell polyomavirüs; MCV) diğer bir virüs grubu human polyomavirüslerdir. Son yıllarda, mikrobiyom ile kolorektal kanser ilişkisine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sağlıklı kişilerdeki virom ile kolorektal kanserli hastalardaki virom arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Kolon virom çeşitliliğinin kolorektal kanserli hastalarda değiştiği gösterilmiştir⁽³⁷⁾. Enterik virom ve bakteriyofajlar, kolorektal kanser patolojisi ve prognoz anlaşılmada ve tedavi geliştirilmesinde klinik olarak ilişkilidir⁽³⁸⁾. *Orthobunyavirüs*, *Tunavirüs*, *Phikzvirüs*, *Betabaculovirüs* ve *Zindervirüs* gibi ökaryotik virüsler kolorektal kanserli kişilerde anlamlı düzeylerde yoğun bulunmuştur. Kanserle ilişkili virom esas olarak ılımlı bakteriyofajları içermektedir. Viromun bakteriyofajları ile bakteriyom arasındaki ilişki bağırsak karsinogenezinin oluşumunda bir faktör olabilir. Bakteriyofajlar, bakteriyel mikrobiyomu şekillendirerek veya direkt kolonik epitel hücrelerine geçerek, kanser hücre davranışlarını etkileyebilir. Kolorektal kanserli hastaların dışkı örneklerinde bakteriyofaj çeşitliliğinin anlamlı düzeylerde arttığı belirlenmiştir⁽³⁷⁾. Özellikle *Siphoviridae* ve *Myoviridae* ailesine ait bakteriyofajların kolorektal kanserde etkileri olabileceği belirlenmiştir.

Diğer hastalıklar: Bakteriyel vajinosis hastalarına ait örneklerde kontrollere göre prokaryotik (bakteriyofaj) ve ökaryotik viral toplulukların oldukça farklı olduğu gözlenmiş ve vajinal viromun, vajinal bakteri topluluğu ve bakteriyel vajinoz ile belirgin şekilde ilişkili olduğu belirlenmiştir⁽³⁹⁾. Kawasaki sendromlu hastaların kanlarında örnek havuzunda, TTV7 sekansları yüksek oranda saptanmış ve hastalık etiolojisinde TTV7'nin rolü olabileceği belirtilmiştir⁽⁴⁰⁾. Pek çok çalışmada, çocuklarda astım ve solunum sistemi hastalıklarının gelişmesi ve alevlenmesinde viromun önemli rol oynadığı düşünülmüştür⁽⁶⁾. Ciddi akut res-

piratuvar enfeksiyonlu çocukların nazofaringeal sürüntü örneklerinde kontrol grubuna göre yüksek oranda viral çeşitlilik belirlenmiştir. Hasta çocuklarda *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Anelloviridae* ve *Adenoviridae* ailesi en çok bulunan türler iken, sağlıklı çocuklarda çeşitliliğin az olduğu ve esas olarak Anellovirüs türlerinin bulunduğu bildirilmiştir⁽⁴¹⁾. Periodontal hastalığı olan kişilerde Myoviridae ailesi bakteriyofajlarında artış olduğu belirlenmiştir⁽³¹⁾.

Sonuç

Virom analizleriyle ilgili yeni nesil sekanslama tekniklerindeki gelişmeler, insan viromunun hastalıklardaki rolünü tam olarak belirlemeye yönelik araştırmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. Özellikle insan bağırsak virom içeriğinde hasta ve sağlıklı kişiler arasında gözlenen değişikliklerin hastalığın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu sorusu gündemdeki yerini korumaktadır. Virom araştırmaları arttıkça ve standart duruma geldiğinde, hem bu soru yanıtını bulacak hem de viroma yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Santiago-Rodriguez TM, Hollister EB. Human virome and disease: High throughput sequencing for virus discovery, identification of phage-bacteria dysbiosis and development of therapeutic approaches with emphasis on the human gut. *Viruses*. 2019;11(7):656. <https://doi.org/10.3390/v11070656>
2. Matijašić M, Meštrović T, Paljetak HČ, Perić M, Barešić A, Verbanac D. Gut microbiota beyond bacteriomyco biome, virome, archaeome, and eukaryotic parasites in IBD. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):2668. <https://doi.org/10.3390/ijms21082668>
3. Wang D. 5 challenges in understanding the role of the virome in health and disease. *PLOS Pathog*. 2020;16(3):e10008318. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008318>
4. Beller L, Matthijnssens J. What is (not) known about the dynamics of the human gut virome in health and disease. *Curr Opin Virol*. 2019;37:52-7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.05.013>
5. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms*. Brock/ Pearson Education Limited, Malezya, 2019.

6. Freer G, Maggi F, Di Cicco ME, Peroni DG, Pistello M. The virome and its major component, anellovirus, a convoluted system molding human immune defenses and possibly affecting the development of asthma and respiratory diseases in childhood. *Front Microbiol.* 2018;9:686. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00686>
7. Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA. Fenner and White's Medical Virology. Elsevier Inc. Hindistan, 2017.
8. Küry P, Nath A, Créange A, et al. Human endogenous retroviruses in neurological diseases. *Trends Mol Med.* 2018;24(4):379-94. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.007>
9. Li W, Lee MH, Henderson L, et al. Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. *Sci Transl Med.* 2015;30:7(307):307ra153. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac8201>
10. Nexø BA, Villesen P, Nissen KK, et al. Are human endogenous retroviruses triggers of autoimmune diseases? Unveiling associations of three diseases and viral loci. *Immunol Res.* 2016;64(1):55-63. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8671-z>
11. Gonzalez-Cao M, Iduma P, Karachaliou N, Santarpia M, Blanco J, Rosell R. Human endogenous retroviruses and cancer. *Cancer Biol Med.* 2016;13(4):483-8. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0080>
12. Lopetuso LR, Ianiro G, Scaldaferrri F, Cammarota G, Gasbarrini A. Gut virome and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(7):1708-12. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000807>
13. Siljander H, Honkanen J, Knip M, Microbiome and type 1 diabetes. *EBioMedicine.* 2019; 46:512-21. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.031>
14. Ungaro F, Massimino L, D'Alessio S, Danese S. The gut virome in inflammatory bowel disease pathogenesis: From metagenomics to novel therapeutic approaches. *United European Gastroenterol J.* 2019;7(8):999-1007. <https://doi.org/10.1177/2050640619876787>
15. Foulongne V. Le virome humain. *Rev Franchoph Lab.* 2015;2015(469):59-65. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(15\)72822-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(15)72822-4)
16. Pia S, Pannaraj PS, Ly M, Cerini C, et al. Shared and distinct features of human milk and infant stool viromes. *Front Immunol.* 2018;9:1162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01162>
17. Sauvage V, Cheval J, Foulongne V, et al. Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. *J Virol* 2011;85(15):7948-50. <https://doi.org/10.1128/JVI.00639-11>
18. Huh H, Wong S, St Jean J, Slavcev R. Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;145(2019):4-17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.003>
19. Neil JA, Cadwell K. The intestinal virome and immunity. *J Immunol.* 2018;201(6):1615-24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800631>
20. Garmeaeva S, Sinha T, Kurilshikov A, Fu J, Wijmenga C, Zhernakova A. Studying the gut virome in the metagenomic era: challenges and perspectives. *BMC Biol.* 2019;17(1):84. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0704-y>
21. Maurice CF. Considering the other half of the gut microbiome: Bacteriophages. *mSystems.* 2019;4(3):e00102-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00102-19>
22. Guerin E, Shkoporov A, Stockdale SR, et al. Biology and taxonomy of crAss-like bacteriophages, the most abundant virus in the human gut. *Cell Host Microbe.* 2018;24(5):653-64. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.002>
23. Koonin EV, Yutin N. The crAss-like phage group: How metagenomics reshaped the human virome. *Trends Microbiol.* 2020;28(5):349-59. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.01.010>
24. Carding SR, Davis N, Hoyles L. Review article: the human intestinal virome in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(9):800-15. <https://doi.org/10.1111/apt.14280>
25. Ghose C, Ly M, Schwanemann LK, et al. The virome of cerebrospinal fluid: viruses where we once thought there were none. *Front Microbiol.* 2019;10:2061. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02061>
26. Ma Y, You X, Mai G, Tokuyasu T, Liu C. A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes. *Microbiome.* 2018;6(1):24. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0410-y>
27. Mohandas S, Pannaraj PS. Beyond the bacterial microbiome: Virome of human milk and effects on the developing infant. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2020;94:86-93. <https://doi.org/10.1159/000504997>
28. Minot S, Sinha R, Chen J, et al. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 2019;21(10):1616-25. <https://doi.org/10.1101/gr.122705.111>
29. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell.* 2015;160(29):447-60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
30. Fernandes MA, Verstraete SG, Phan TG, et al. Enteric virome and bacterial microbiota in children with ulcerative colitis and crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019;68(1):30-6.

- <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002140>
31. Zuo T, Lu XJ, Zhang Y, et al. Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut*. 2019;68(7):1169-79.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318131>
 32. Zhao G, Vatanen T, Droit L, et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(30):E6166-75.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1706359114>
 33. Rasmussen TS, Mentzel CMJ, Kot W, et al. Faecal virome transplantation decrease symptoms of type-2-1 diabetes and obesity in a murine model. *Gut*. 2020;69(12):2122-30.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320005>
 34. Monaco CL, Gootenberg DB, Zhao G, et al. Altered virome and bacterial microbiome in human immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome. *Cell Host Microbe*. 2016;19(3):311-22.
<https://doi.org/doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.011>
 35. Siqueira JD, Curty G, Xutao D, et al. Composite analysis of the virome and bacteriome of HIV/HPV co-infected women reveals proxies for immunodeficiency. *Viruses*. 2019;11(5):422.
<https://doi.org/10.3390/v11050422>
 36. Li L, Deng X, Linsuwanon P, et al. AIDS alters the commensal plasma virome. *J Virol*. 2013;87(19):10912-5.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01839-13>
 37. Nakatsu G, Zhou H, Wu WKK. Alterations in enteric virome are associated with colorectal cancer and survival outcomes. *Gastroenterol*. 2018;155(2):529-41.e5.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.018>
 38. Emlet C, Ruffin M, Lamendella R. Enteric virome and carcinogenesis in the gut. *Dig Dis Sci*. 2020;65(3):852-64.
<https://doi.org/10.1007/s10620-020-06126-4>
 39. Jakobsen RR, Haahr T, Humaidan P, et al. Characterization of the vaginal DNA virome in health and dysbiosis: an opening study in patients with non-female factor infertility. *bioRxiv*. 2019:755710.
<https://doi.org/10.1101/755710>
 40. Thissen JB, Isshiki M, Jaing C, et al. A novel variant of torque teno virus 7 identified in patients with Kawasaki disease. *PLoS One*. 2018;13(12):e0209683.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209683>
 41. Wang Y, Zhu N, Li Y, et al. Metagenomic analysis of viral genetic diversity in respiratory samples from children with severe acute respiratory infection in China. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(5):458.e1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.006>

COVID-19 Pandemisinde Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri

Microbiological Diagnostic Methods in COVID-19 Pandemic

Aybala Temel*¹, Aşegül Ateş**², Bayrı Eraç**²

*İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

**Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Temel A, Ateş A, Eraç B. COVID-19 pandemisinde mikrobiyolojik tanı yöntemleri, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):99-108.

Öz

Dünya genelinde bir milyondan fazla insanın ölümüne neden olan COVID-19 pandemisi; enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve salgınların kontrol altına alınmasında mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin kritik önemini açıkça göstermiştir. SARS-CoV-2 ile mücadelede en etkili yol, virüsün yayılımını olabildiğince azaltmaktır. Virüsün yayılımını azaltmak ise virüsü taşıyan semptomatik veya asemptomatik tüm bireylerin, en kısa sürede ve doğru şekilde saptanmasını sağlayan tanı yöntemleriyle olasıdır. COVID-19 hastalığının tanısında ve takibinde, uluslararası sağlık otoriteleri tarafından önerilen çeşitli mikrobiyolojik yöntemler (serolojik testler, nükleik asit amplifikasyon yöntemleri) yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından COVID-19 laboratuvar tanısında altın standart yöntem olarak belirtilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) metodu dâhil olmak üzere farklı diagnostik yöntemlerin uygulanmasında yaşanan zorluklar pandemi sürecinde bir kez daha anlaşılmıştır. Enfeksiyonlarla mücadelede daha yüksek başarı sağlayabilmek için mevcut mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin uygulama ve değerlendirme standartlarının iyi belirlenmesi, daha kısa sürede doğru şekilde sonuç veren, kolay uygulanabilen, düşük maliyetli yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: COVID-19, SARS-CoV-2, RT-PZR, serolojik testler, CRISPR

ABSTRACT

COVID-19 pandemic that caused the death of more than one million people worldwide, has clearly demonstrated the critical importance of microbiological diagnostic methods in preventing infectious diseases and controlling outbreaks. The most effective way for combating SARS-CoV-2, is reducing the spread of the virus as much as possible. To decrease the spread of the virus is only possible with diagnostic methods that enable the detection of all symptomatic or asymptomatic patients infected with the virus accurately and as early as possible. Various microbiological methods (serological tests, nucleic acid amplification methods) recommended by international health authorities are widely used in the diagnosis and follow-up of COVID-19 disease. The challenges experienced in application of diagnostic methods, including real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method, which is specified as the gold standard method in the diagnosis of COVID-19 by the World Health Organization, were once again acknowledged during the pandemic. To achieve higher success rates in combating infections, it is necessary to better determine the application and evaluation standards in current microbiological diagnostic methods, to develop new cost-effective methods that are easily applicable and yielding results within a short time.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, RT-PCR, serological tests, CRISPR

Alındığı tarih / Received:
26.01.2021 / 26.January.2021

Kabul tarihi / Accepted:
30.03.2021 / 33.March.2021

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

A. Temel 0000-0003-1549-7219

A. Ateş 0000-0001-6891-6662

B. Eraç 0000-0002-6343-2519

✉ aybالاتemel@hotmail.com

GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları, özellikle viral pandemiler yüzyıllardır toplum sağlığını tehdit eden başlıca küresel sorunlardandır. Yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla salgın hastalıklar, çok sayıda insanın yaşamını tehdit etmesinin yanı sıra sağlık bakım giderlerinde

artış, iş gücü kaybı gibi önemli ekonomik sorunları da beraberinde getirir. Küresel salgınların sonucusu; bir yılı aşkın süredir ülkemizi ve tüm dünyayı etkisi altına almış olan Koronavirüs Hastalığı (COVID-19)'dır^(1,2).

2019 yılı aralık ayında, ilk olarak Çin'in Wuhan şehrinde, nedeni belirlenmeyen ve sayıları hızla artan

pnömoni olguları dikkat çekmiş ve kısa süre sonra bu durumun yeni bir koronavirüsten kaynaklandığı saptanmıştır⁽³⁾. SARS-CoV-2 olarak adlandırılan virüsün, geçtiğimiz yıllarda farklı ülkelerde çok sayıda hastanın ölümüne neden olan Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) etkeni betakoronavirüsler ile benzer genetik yapıda olduğu anlaşılmıştır^(4,5). Hastalık dört ay gibi oldukça kısa bir sürede tüm dünyayı etkisi altına almış olup, 11 Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 hastalığı "pandemi (küresel salgın)" olarak ilan edilmiştir. Salgının başlangıcından yaklaşık bir yıl sonrasında, 24 Ocak 2021 itibariyle 95 milyon üzerinde doğrulanmış olgu olduğu ve 2.112.689 kişinin yaşamını kaybettiği DSÖ tarafından rapor edilmiştir. Türkiye'de ilk COVID-19 olgusu ise 11 Mart 2020'de belirlenmiş olup, Sağlık Bakanlığınca 24 Ocak 2021 itibariyle ülkemizde olgu sayısının 2.429.605 kişiye ulaştığı bildirilmiştir. SARS-CoV-2'nin bulaşıcılığın yüksek olması, salgının kontrol altına alınmasını güçleştiren ana etmenddir. COVID-19 hastalığında bulaş hızının düşürülerek yayılımın azaltılabilmesi için enfeksiyonun olabildiğince erken ve doğru şekilde tanısı gerekmektedir. Ülkemizde ve dünyada hastalığın tanısında ve takibinde, uluslararası sağlık otoritelerince önerilen çeşitli moleküler mikrobiyolojik yöntemler (nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, serolojik testler) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları doğrudan virüsün varlığını saptamaya yönelik moleküler yöntemler iken bazıları ise virüse karşı vücutta oluşan bağışıklık yanıtın saptanması prensibine dayanmaktadır.

Virüsün Yapısı ve Hastalık Patogenezi

COVID-19 salgının ortaya çıkışından kısa süre sonra, Ocak 2020'de, Wuhan'daki hastaların akciğerlerinden alınan örneklerden virüs izole edilerek genom analizi yapılmıştır. İlk olarak Çinli araştırmacılar tarafından 12 Ocak 2020 tarihinde SARS-CoV-2'nin genom dizilimi, tüm dünyadan araştırmacıların erişebildiği açık veri tabanlarında paylaşıldı⁽⁶⁾. SARS-CoV-2'un genom dizilerinin hızla belirlenmesi ve paylaşılması; virüsün yapısının ve hastalık oluşturma mekanizmasının anlaşılması, tanı yöntemlerinin belirlenebilme-

si, devam eden salgının takibi ve potansiyel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından büyük yarar sağlamıştır.

SARS-CoV-2 virüsü, *Coronaviridae* ailesinde yer alan, pozitif iplikli tek sarmallı RNA genomuna sahip zarflı bir virüstür. Yapılan genom araştırmalarıyla bu virüsün, geçtiğimiz yirmi yıl içerisinde farklı ülkelerde salgınlara yol açan SARS-CoV ve MERS-CoV'un da aralığında bulunduğu betakoronavirüs (*beta-CoV*) ailesi üyelerinden olduğu belirlenmiştir. SARS-CoV-2'nin genom yapısının SARS-CoV ile %79, MERS-CoV ile de yaklaşık %50 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır⁽⁷⁾. Virüsün zarf proteini (E, envelope), membran proteini (M), nükleokapsid proteini (N) ve spike protein (S) olmak üzere dört yapısal proteini mevcuttur. Bu protein yapılarından özellikle spike (S) proteini, virüsün konak hücreye tutunması ve girişinde kilit rol oynar⁽⁸⁾. Virüs, S proteini aracılığıyla konakçı hücre zarının dış kısmındaki ACE-2 (Anjiyotensin dönüştürücü enzim) reseptörlerine bağlanarak konak hücreye girmekte ve sonrasında hızla çoğalarak hastalığa neden olur. ACE-2 reseptörlerinin insan vücudunda akciğerler, kalp ve böbrekler başta olmak üzere farklı doku ve organlarda bulunduğu bilinir⁽⁹⁾. Bu nedenle COVID-19 hastalığında, virüsün konak hücreye girişinin ardından enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında organizmada şiddetli akut solunum yetmezliği başta olmak üzere pek çok doku ve organı etkileyen ağır klinik tablolar gelişebilir⁽⁹⁾.

Hastalığın Bulguları ve Tanısı

COVID-19 tanısı alan bireylerde sık görülen klinik bulgular ateş, öksürük, şiddetli kas ağrıları, artmış balgam üretimi, nefes darlığı, boğaz ağrısı, koku kaybı ve baş ağrısı olarak sıralanır⁽¹⁰⁾. Hastanın yaşı, bağışıklık durumu, kronik hastalıklarının (kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabet, hipertansiyon vb.) varlığı söz konusu semptomların daha şiddetli gözlenmesine, akut solunum yetmezliği, septik şok ya da pıhtılaşma bozukluğu gibi ciddi ve ani gelişen klinik tablolara neden olabilir⁽³⁾. Bununla birlikte, semptomatik olguların yanı sıra COVID-19 salgınında asemptomatik olguların sayıca hayli fazla olduğuna ve klinik belirti göstermeyen bu enfekte bireylerin virüsü

bulaştırma düzeylerinin de yüksek olduğuna dikkat çeken çalışma sonuçları mevcuttur⁽¹¹⁾. COVID-19 salgınıyla mücadelede halen en etkili ve geçerli yol, virüsün yayılımını olabildiğince azaltmaktır. Bu ise ancak virüsü taşıyan semptomatik ve/veya asemptomatik tüm bireylerin, en kısa sürede ve doğru şekilde saptanmasını sağlayan tanı yöntemleriyle olasıdır. Dünya genelinde COVID-19'un laboratuvar tanısında nükleik asit amplifikasyon yöntemleri (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, RT-PCR), serolojik testler ve bilgisayarlı tomografi (BT) bulguları tanı koymada sık kullanılan yöntemlerdir⁽¹²⁻¹⁴⁾. Ayrıca COVID-19 salgınında mevcut tanı yöntemlerindeki bazı zorluklar ve kısıtlılıklar; CRISPR temelli tanı yaklaşımları başta olmak üzere alternatif ve yenilikçi tekniklere ilgiyi arttırmıştır.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

COVID-19 olgularının belirlenmesi ve doğrulanmasında; Dünya Sağlık Örgütü'nün protokol ve önerileri doğrultusunda, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi altın standart olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır⁽¹⁴⁾. RT-PCR yöntemi, hastadan alınan örnekte SARS-CoV-2 virüsüne ait nükleik asit varlığının araştırılması prensibine dayanan bir moleküler tanı yöntemidir. Hastadan alınan solunum yolu örnekleriyle (orofarenks ve nazofarenks sürüntüsü, balgam, bronkoalveolar lavaj) yapılan testte; virüsün genomunda yer alan ve nükleotid dizilimi bilinen farklı bölgelerin saptanarak çoğaltılması hedeflenir. Bu amaçla özel tasarlanmış primer dizileri, Taq polimeraz enzimi, uygun tampon çözeltileri ve kopyalanan genetik materyale bağlanma özelliğine sahip boyalar kullanılmaktadır. Hastadan alınan örnekte viral nükleik asitin bulunması durumunda bu nükleik asidin çok sayıda kopyası elde edilmekte, floresan boya veya probler yardımıyla eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir^(15,16).

Özellikle COVID-19 semptomları gösteren şüpheli olguların doğrulanması, şüpheli veya kesin tanı alan COVID-19 hastasıyla temaslı bireylerin taranması ve COVID-19 hastalarının karantinadan çıkışına karar verilmesinde RT-PCR yönteminden yararlanılmakta-

dır^(14,17,18). Kantitatif sonuç veren, analitik duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bu moleküler test yöntemi rutin tanıda yaygın olarak kullanılsa da bazı kısıtlılıkları olduğu bilinir. Literatürde yer alan farklı araştırma ve istatistiksel değerlendirmelerde, SARS-CoV-2 RT-PCR testlerinin tanısız açıdan doğruluğunun düşük olduğuna, yanlış negatif sonuçların azımsanamayacak sıklıkta olduğuna dikkat çekilmektedir^(19,20).

RT-PCR testinin duyarlılığı ve güvenilirliği; hastadan alınan örnek tipi ve alındığı bölge, örnek alma zamanı, örnek saklama koşulları gibi pek çok preanalitik faktörle doğrudan ilişkili olabilmektedir. Hastadan örneğin erken ya da geç evrede alınmış olması, örnekte viral yükün testle saptanamayacak kadar düşük olması, test örneği alınmadan önce antiviral ilaç kullanımı, örneğin doğru şekilde ve uygun bölgeden alınmaması, analiz öncesi uygun koşullarda saklanmaması, test ortamında PCR inhibitörlerinin varlığı RT-PCR testinde yanlış negatif sonuçlara neden olan durumlardan bazılarıdır^(21,22).

Tanı testi için hastadan alınan örnek tipi ve örnek alma zamanı da test sonucunun duyarlılığını çok büyük ölçüde etkileyen bir parametredir. Örnek tipinin test duyarlılığına etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, RT-PCR test duyarlılığının boğaz sürüntüsü örneklerinde %32 iken, balgamda %72, bronkoalveolar lavaj için %93 olduğu belirtilmiştir⁽²³⁾. Örnek alma zamanı ile test duyarlılığı arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir başka çalışmada ise, hastalığın sekizinci gününden önce alınan solunum yolu örneklerinde %66.7 olarak saptanan viral RNA pozitifliğinin, 8.-14. günler arasında %54'e, 15. gün ve sonrasında ise %45.5'e kadar düştüğü bildirilmiştir⁽²⁴⁾.

COVID-19 tanısında en doğru sonucun alınabilmesi için alt ve üst solunum yolu örneklerinin (balgam, bronkoalveolar lavaj) kullanılması önerilirken kan, idrar ve dışkı örneklerinden yapılan testlerin oranla düşük duyarlılıkta olduğu rapor edilmiştir^(25,26). Hastadan alınacak bronkoalveolar lavaj ve balgam gibi solunum yolu örnekleri tanı açısından daha güvenilir kabul edilmekle birlikte, bu örneklerin alınmasının aerosol oluşumu vb. nedenlerle sağlık çalışanları açısından daha yüksek risk oluşturduğu da

unutulmamalıdır. Bu nedenle örnek alma işlemi eğitilmiş ve yetkili sağlık personeli tarafından, kişisel koruyucu ekipman kullanılarak biyogüvenlik kurallarına uygun şekilde yapılmalıdır. Hastadan sürüntü örnekleri özel eküvyonlarla alınıp virüsün taşınması için uygun ortamı içeren özel kaplarda saklanmalı ve test edilecek örnek +4°C'de tutularak olabildiğince en kısa sürede analiz için laboratuvara gönderilmelidir. Testin doğru ve güvenilir sonuç verebilmesi için örnek alma işleminden test sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her bir aşamada ulusal ve uluslararası sağlık otoritelerince belirlenmiş protokol ve standartlara uygun şekilde çalışılması gerekir.

COVID-19 tanısında moleküler testlere ek olarak radyolojik tanı yöntemi olan bilgisayarlı tomografi (BT) sonuçlarından da yararlanılmakta, hastaların akciğer grafilerinde yer alan bulguların, doğru ve erken tanı açısından yarar sağlayabildiği belirtilmiştir. Yapılan ilk RT-PCR testi negatif olup, bilgisayarlı tomografi sonucu pozitif olarak değerlendirilen çok sayıda hastada, ilerleyen günlerde yinelenen PCR testinde pozitif sonuç alındığını bildiren çalışma sonuçları literatürde yerini almıştır⁽²¹⁾. Çin'de 82 olguyla yürütülen klinik gözleme dayalı bir araştırmada, hastaların bilgisayarlı tomografi sonuçlarının PCR test sonuçları ile beraber değerlendirilmesi durumunda, %79 olan RT-PCR duyarlılığının %94'e yükseldiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, virüsün akciğerde tutulumunun gözlemlendiği bilgisayarlı akciğer tomografisi bulgularının RT-PCR test sonuçlarında yanlış negatiflik oranlarının azaltılmasında ve hastalığın erken tanısında katkı sağlayabileceğine dikkat çekilmiştir⁽²⁷⁾.

Serolojik Testler

Serolojik test yöntemleri daha çok viral nükleik asidin saptanamadığı durumlarda, asemptomatik olguların saptanmasında ve enfeksiyonu geçiren kişilerde bağışıklık yanıtın izlenmesi amacıyla kullanılır⁽²⁸⁾. Antijen/antikor testleri adıyla da bilinen bu testler; viral antijenin ya da virüse karşı vücutta oluşan antikor yanıtının belirlenmesi prensibine dayanır. Yapılan araştırmalar, SARS-CoV-2 virüsü vücuda alındıktan sonra virüse karşı antikor yanıtının gelişmesinin yaklaşık bir hafta sürebildiğine işaret eder. Bu nedenle antikor

yanıtını ölçmeye yönelik serolojik testlerin hastalığın erken tanısı amacıyla kullanımı önerilmemekte, bu testlerden daha çok kitlesel taramalarda yararlanılmaktadır^(14,29). SARS-CoV-2'nin yapısal N ve S proteinlerinin antijenik bölgeleri veya bu antijenik yapılara karşı vücutta gelişen antikorları saptamaya yönelik farklı serolojik testler vardır. SARS-CoV-2'nin nükleokapsid proteini (N); virüsün çoğalmasında görev alır. COVID-19 hastalarında ilk 14 gün içerisinde serum ve idrarda en yüksek seviyede gözlenen N proteini, erken tanıda kullanılan önemli bir antijenik yapıdır^(30,31). Virüsün bir diğer önemli yapısal proteini S glikoproteini ise virüsün konak hücrede ilgili reseptöre tutunmasını sağlar. S proteini ve bu antijenik yapıya karşı oluşan antikorların tespitinden, hastalığın tanısından daha çok nötralizan antikor ve aşı çalışmalarında yararlanılır^(19,22,31). N antijenine karşı oluşan IgG ve IgM antikorlarını saptayan testlerin daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir⁽³¹⁾. Ayrıca rekombinant teknolojiyle üretilmiş N ve S antijenini birlikte içeren ticari serolojik test kitleri de geliştirilerek FDA (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) onayıyla kullanıma sunulmuştur. İnsan vücudunda SARS-CoV-2'ye karşı IgG ve IgM antikor yanıtının genellikle semptomların başlangıcından 3-6 gün sonrasında oluştuğu ve yaklaşık üç hafta sürebildiği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü SARS-CoV-2'yi saptamaya yönelik serolojik testlerin uygulanacağı durumlarda, hastadan yalnızca tek bir serum örneği alınacaksa; semptomların başlangıcından en az üç hafta sonra alınan örnekle test yapılmasını önerir⁽²⁵⁾.

Yapılan araştırmalarda, COVID-19 hastalığı geçiren ve antikor yanıtı gelişen hastalarda, IgG antikorlarının vücutta daha uzun süre kalıcılık gösterdiğine dikkat çekilirken, her iki antikor için de net bir bağışıklık süresi henüz belirlenememiştir^(2,32,33). Ayrıca hastalığı bir kez geçiren ve COVID-19 antikor pozitif olan bir hastanın, ikinci bir SARS-CoV-2 enfeksiyonundan kesin olarak korunduğuna dair yeterli ve net bilimsel kanıt yoktur⁽³⁴⁾.

COVID-19 hastalığının serolojik tanısında antikor testlerinin yanı sıra viral proteinlerin saptanmasına yönelik antijen testleri de mevcuttur. SARS-CoV-2 antijen testleri genellikle virüsün nükleokapsid anti-

jeninin saptanmasına yönelik testler olup, solunum yolu örnekleri kullanılarak yapılır. Söz konusu hızlı antijen testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünün, nükleik asit temelli yöntemlere kıyasla düşük olduğu belirtilir. Yüksek viral yüke sahip olguların saptanmasında başarılı sonuçlar elde edilebilen, ancak hastada viral yükün düşük olması veya örnek tipine bağlı olarak hatalı negatif sonuç verebilen antijen testleri; çoğunlukla hızlı bir değerlendirmenin gerektiği ve PCR testinin yapılamadığı durumlarda kullanılır. Antijen testinin negatif sonuç vermesi durumunda enfeksiyonun dışlanmaması, hasta örneğinin daha yüksek duyarlılıkta olan PCR yöntemi ile değerlendirilmesi önerilir^(14,17,18).

Serolojik testler, duyarlılığın ve özgüllüğünün değişken olduğu bilinen, çapraz reaksiyona bağlı negatif sonuç verebilen test yöntemleri olduğu için COVID-19 hastalığının erken tanısında tek başına kullanılması önerilir⁽³⁵⁾. Antijen-antikor testlerinden daha çok kitlesel taramalarda, belirli bir toplulukta hastalığa karşı bağışıklık düzeyini saptamada, salgın sürecinde temaslıların takibinde, terapötik veya nötralizan antikor taşıyabilecek bireylerin tespitinde yararlanılır.

CRISPR Temelli Tanı Yaklaşımları

COVID-19 salgınında antikor testlerinin akut enfeksiyon döneminde kanda düşük antikor düzeyini saptamadaki kısıtlılığı, hızlı antijen testlerinin düşük özgüllük göstermesi, RT-PCR yönteminin uygulanmasından değerlendirilmesine kadar özel ekipman ve eğitimli personel gerektirmesi mikrobiyoloji laboratuvarlarında SARS-CoV-2 tanısında karşılaşılan başlıca güçlükler olarak dikkat çekmiştir^(24,36,37). Hızla artan olgu sayıları nedeniyle tanı test kapasitelerinin aşılması, yoğun laboratuvar prosesinin ardından hızla sonuç verme gereksinimi, SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda sekonder viral enfeksiyonların görülmesi durumları da COVID-19 tanısında zorlayıcı diğer etkenlerdir⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. Karşılaşılan bu sorunlar enfeksiyon hastalıklarıyla mücadele açısından özgüllüğü yüksek, pratik, uygun maliyette, yenilikçi ve alternatif tanı yöntemlerinin gerekliliğini bir kez daha gözler önüne sermiştir. Son yıllarda geliştirilen yeni nesil tanı yöntemleri arasında viral nükleik asitlerin saptanmasına yönelik hassas

ve hızlı sonuç veren moleküler yaklaşımlar ön plana çıkar. 2020 Nobel Kimya ödülü alan CRISPR/Cas sisteminin de aralarında bulunduğu yeni nesil nükleik asit saptama yöntemleri; enfeksiyon etkenlerinin, zirai patojenlerin, RNA ile ilişki farklı hastalıkların tespitinde kullanıma potansiyelleri ile son yıllarda öne çıkmıştır⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrarlar) temelli tanı yöntemleri; viral enfeksiyonların tanısında umut vadeden yenilikçi yöntemlerin başında gelir. Bakterilerin kendilerini faj ve plazmid gibi yabancı genomik materyallere karşı korumak için oluşturdukları adaptif immün sistem olarak tanımlanan CRISPR/Cas sistemi temelde; yabancı genomik materyalin özgün bir bölgesini hedefleyen bir rehber RNA dizisi (gRNA) ve efektör Cas (CRISPR-associated nuclease) proteinlerinden oluşturur. Spacer (aralayıcı) ve repeat (tekrar) bölgelerinden oluşan genomik ve Cas komponentlerinden meydana gelen protein yapısıyla kompleks bir bütün olan bu sistem farklı sınıf, tip ve alt tiplerle bakteri ve arkelerin oluşturduğu savunma sistemidir⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. En net şekilde aydınlatılan ve çalışılan Tip 2 CRISPR/Cas9 sistemi; moleküler biyolojide büyük etki yaratarak ökaryotik hücrelerde gen düzenleme, gen terapisi, genetik mühendisliği uygulamalarının önünü açmıştır. Günümüzde genetik temelli bazı hastalıkların, kanserin, otoimmün sorunların ve daha pek çok hastalığın tedavisinde yeni, uyarlanabilir bir yaklaşım olan CRISPR teknolojisinden tarım, gıda, biyoenerji gibi pek çok farklı sahada da yararlanılmaktadır⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. Enfeksiyon hastalıkları açısından CRISPR/Cas sisteminin en önemli etkisi ise Cas proteinlerinden yararlanılarak patojenlerin tanımlanması ve nükleik asit temelli tanı gerçekleştirilebilmesi olmuştur^(52,53). Pandemi öncesinde de bazı viral patojenlerin tanısında kullanılan CRISPR/Cas temelli tanı testleri COVID-19 pandemisiyle birlikte SARS-CoV-2 tanısına yönelik olarak adapte edilmiştir. Temel prensipleri hastadan alınan üst solunum yoluna ait örneklerden viral RNA'nın izolasyonu, uygun primerler vasıtasıyla tanı için hedeflenmiş gen bölgelerinin amplifikasyon yöntemleri ile çoğaltılması, seçilen uygun efektör Cas proteini ve hedef gen bölgesine komplementer reh-

ber RNA ile amplifikasyon ürününün bir araya getirilmesi sonucunda test sonucunun test stripleri üzerinden okunması üzerine kurulmuştur. RT-PCR testlerinin kısıtlılıkları göz önünde bulundurulduğunda daha yüksek özgüllük, uygun maliyet, kolay taşınabilme ve hızlı sonuç verme kapasiteleriyle CRISPR temelli tanı testleri belirli avantajlar sağlayabilir. Günümüzde FDA tarafından acil kullanım izni verilerek onaylanmış iki adet CRISPR temelli COVID-19 tanı testi vardır⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Özellikle CRISPR/Cas sistemindeki efektör proteinlerden Cas9, Cas12, Cas13, Cas3 kullanılarak tasarlanan tanı yöntemleri hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, uygun maliyette, kolay adapte edilebilir, kompakt ve taşınabilir yeni yaklaşımların ortaya çıkarılmasını sağlamıştır⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾.

Cas12: Tip V CRISPR/Cas sisteminin efektör proteini olan Cas12; özellikle gRNA (guide RNA) aracılığıyla ssDNA (single-stranded DNA) yapısında kesikler oluşturabilir ve gen düzenleme çalışmalarında tercih edilmektedir⁽⁵⁷⁾. 2018'de geliştirilen CRISPR Temelli DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) tanı kitinin ana prensibi, Cas12 proteini üzerinden DNA'nın tanımlanmasıdır⁽⁵⁸⁾. COVID-19 pandemisiyle birlikte SARS-CoV-2'nin korunmuş genomik bölgeleri olan N ve E bölgeleri üzerinden tanımlanmasını sağlayacak şekilde DETECTR tanı sistemi adapte edilmiştir⁽⁵⁹⁾. 2020 yılı temmuz ayında FDA tarafından COVID-19 tanısında "SARS-CoV-2 RNA DETECTR Assay" tanı kitinin kullanımı onaylanmıştır. Bu tanı kitinin temel uygulanma protokolü, COVID-19 şüphesiyle gelen hastanın üst solunum yoluna ait örneklerden (orofarenks, nazofarenks, burun sürüntüsü, nazofaringeal veya nazal aspirat) viral RNA'nın izolasyonu, izole edilen RNA'dan N ve E bölgelerinin uygun primerlerle RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) ile amplifikasyonu, hedef bölgelere spesifik crRNA (CRISPR-RNA)'ların Cas12a ile kompleks oluşturması ve oda sıcaklığında 2 dakikalık inkübasyon sonunda test sonucunun görsel olarak okunması şeklindedir. Bu yöntemle SARS-CoV-2 tanısında hasta örneklerinin alınmasından yaklaşık 40 dakika gibi oldukça kısa bir süre sonrasında test sonucunun gözlemlenebilmesi CRISPR temelli tanının önemli üstünlüklerinden birisi olarak değerlendirilir. Ayrıca testin duyarlılık

aralığının 10-50 kopya/μL olduğu bildirilmekte olup, düşük düzeyde viral nükleik asit varlığının dahi oldukça hassas saptanabildiğine işaret edilir. DETECTR testinin CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından önerilen RT-PCR testi ile karşılaştırıldığı 82 klinik örnekle yürütülen çalışmada, %100 özgüllük, %95 spesifiteyle çalıştığı bildirilmiştir^(38,55,59). Testin performansını düşüren en önemli faktör ise diğer moleküler yöntemlerde olduğu gibi, özellikle amplifikasyon öncesi ve sonrasında personel, kimyasallar veya ortama bağlı oluşabilecek kontaminasyonlardır⁽⁵⁹⁾.

Cas 13: Tip VI CRISPR/Cas sisteminin efektör proteini olan Cas13; ssRNA (single-stranded RNA) üzerinde uygun baz eşleşmesi sağlandığında RNase aktivitesi gösterir⁽⁶⁰⁾. Cas13; hedef bölge ve reporter moleküllerde kesimin gerçekleşmesi yoluyla nükleik asit temelinde tanının yapılmasına olanak sağlar. Cas13 kullanılarak 2017 yılında geliştirilen nükleik asit temelli tanımlama sistemi olan SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) testi, direkt hasta serum ve idrarından Zika ve Dengue virüs tayini için kullanılır. Bunlara ek olarak, COVID-19 pandemisiyle birlikte SHERLOCK protokolü; Orf1ab (yapısal olmayan proteinleri kodlayan gen) ve S geni üzerinden SARS-CoV-2 için adapte edilerek Mayıs 2020'de FDA tarafından kullanım onayı almıştır^(56,61-63). SHERLOCK testinin temel protokolü ise, COVID-19 şüphesiyle gelen hastadan alınan üst solunum yolu veya bronkoalveolar lavaj örneğinden viral RNA izolasyonu ile başlar. İlk aşamada, RT-LAMP ile SARS-CoV-2 RNA'sı DNA'ya reverse transkripte edilir. Sonrasında istenilen gen bölgesi amplifiye edilir ve ardından amplifiye edilmiş gen bölgeleri RNA'ya transkripte edilir. Hedef RNA sekansına göre programlanmış CRISPR kompleksinin (Cas13a:crRNA) aktivitesi sonucunda test stribinde renk değişikliği görsel olarak değerlendirilebilmektedir. SHERLOCK tanı testinin duyarlılık aralığı 10-100 kopya/μL'dir^(56,63). Ayrıca SHERLOCK tanı test protokolündeki iki adımı tek bir basamağa indirgeyen, hızlı viral RNA izolasyonu olanağı sunan ve floresans ışımaya şeklindeki test sonucunun akıllı telefon uygulamasıyla değerlendirilmesini sağlayan SHINE (Sherlock and Hudson Integration to Navigate Epidemics) Arizti-Sanz ve

arkadaşları tarafından geliştirilmiştir⁽⁶⁴⁾.

Mikroçip temelli CRISPR tanı sistemi olarak bilinen CARMEN (Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids) paneli, insanlarda enfeksiyonlarla ilişkili 169 virüsün tanısına yönelik kapasiteye sahip olmakla birlikte, İnfluenza A'nın tiplendirilmesinde ve HIV ilaç direnç genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde kullanılır. COVID-19 pandemisiyle birlikte CARMEN test kiti adapte edilmiş olup, SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ve MERS-CoV ile ayırımını yapabilmektedir. Dört yüzden fazla örneğin eşzamanlı olarak çalışabilmesine olanak tanıyan çoklu panel yapısıyla bu yöntemde çok sayıda örnekte pek çok farklı patojenin taranması olası olmaktadır⁽³⁸⁾. Özellikle salgın durumlarında olgu sayılarındaki artışa bağlı olarak daha hızlı, kolay, uygun maliyette, yoğun laboratuvar çalışması gerektirmeyen tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu kapsamda, CRISPR temelli tanı testleri, RT-PCR yönteminde mevcut bazı kısıtlılıkların aşılması açısından umut vadeden yeni moleküler yaklaşımlardan olup, son yıllarda bu alanda çalışmalar büyük ivme kazanmıştır.

Dünya genelinde yüz milyonun üzerinde kişinin virüsle enfekte olduğu ve bir milyondan fazla insanın ölümüne neden olan COVID-19 salgınıyla, enfeksiyon hastalıklarının kontrol altına alınabilmesi için erken dönemde, doğru ve hızlı sonuç veren tanı yöntemlerin önemi bir kez daha açıkça anlaşılmıştır. COVID-19 başta olmak üzere, tüm enfeksiyon hastalıklarıyla daha etkin mücadele açısından mevcut mikrobiyolojik tanı yöntemlerin optimizasyonuna ve yeni moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmaların büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gorbalenya A, Baker S, Baric R, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5:536-44. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
3. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
4. de Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(8):523-34. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
5. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395:565-74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
6. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-36. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
7. Boheemen SV, Graaf MD, Lauber C. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio.* 2013;3(6): e00473-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00473-12>
8. Jin Y, Yang H, Wangquan J, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses.* 2020;12(4):372. <https://doi.org/10.21608/nrmj.2020.118446>
9. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5):E1-9. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.5.e1>
10. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical characteristics of Coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708-20. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
11. Rothe C, Schunk M, Sothmann P, et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N Engl J Med.* 2020;382(10):970-1. <https://doi.org/10.1056/nejmc2001468>
12. Li D, Wang D, Dong J, et al. False-negative results of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: Role of deep-learning-based ct diagnosis and insights from two cases. *Korean J Radiol.* 2020;21(4):505-8. <https://doi.org/10.3348/kjr.2020.0146>
13. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(5):453-4. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>

14. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance 1-7, World Health Organization. [https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501] (Erişim tarihi: 19/01/2021).
15. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
16. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, et al. Diagnosing COVID-19: The disease and tools for detection. *ACS Nano.* 2020;14(4):3822-35. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>
17. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, et al. Diagnostic testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A narrative review. *Ann Intern Med.* 2020;172(11):726-34. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
18. Tang Y, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):e00512-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>
19. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020;323(22):2249-51. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>
20. Watson J, Whiting PF, Brush JE. Interpreting a COVID-19 test result. *BMJ.* 2020;369: 1-7. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1808>
21. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(7):1070-6. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0285>
22. Lu H, Stratton CW, Tang YW. An evolving approach to the laboratory assessment of COVID-19. *J Med Virol.* 2020;92:1812-7. <https://doi.org/10.1002/jmv.25954>
23. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020;323(11):1061-9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
24. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;71(16):2027-34. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>
25. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol.* 2020;30(3):e2106. <https://doi.org/10.1002/rmv.2106>
26. Yongchen Z, Shen H, Wang X, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):833-6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756699>
27. He J, Luo L, Luo Z et al. Diagnostic performance between CT and initial real-time RT-PCR for clinically suspected 2019 coronavirus disease (COVID-19) patients outside Wuhan, China. *Respir Med.* 2020;168:105980. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105980>
28. Patel R, Babady E, Theel E, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio.* 2020;11(2):e00722-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00722-20>
29. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: A prospective study. *Lancet.* 2003;361(9371):1767-72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13412-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13412-5)
30. Vashist SK. In vitro diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. *Diagnostics.* 2020;10(4):1-7. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040202>
31. Zhong L, Chuan J, Gong B, et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci China Life Sci.* 2020;63(5):777-80. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1688-9>
32. Jin Y, Wang M, Zuo Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis.* 2020;94:49-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.065>
33. Zhao R, Li M, Song H, et al. Early detection of SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients as a serologic marker of infection. *Clin Infect Dis.* 2020;71(16):2066-72. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa523>
34. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun.* 2020;11(1):4704. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18450-4>
35. Ismail AA. Serological tests for COVID-19 antibodies: Limitations must be recognized. *Ann Clin Biochem.* 2020;57(4):274-6. <https://doi.org/10.1177/0004563220927053>
36. Kilic T, Weissleder R, Lee H. Molecular and immunological diagnostic tests of COVID-19: Current status and challenges. *iScience.* 2020;23(8):101406. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101406>
37. Woloshin S, Patel N, Kesselheim A. False negative tests for SARS-CoV-2 infection - challenges and implications.

- N Engl J Med. 2020;383(6): e38.
<https://doi.org/10.1056/NEJMp2015897>
38. Metsky HC, Freije CA, Kosoko-Thoroddsen TF, Sabeti PC, Myhrvold C. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design. *bioRxiv*. 2020.02.26.967026.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.26.967026>
39. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*. 2018;360(6387):444-8.
<https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
40. Wang M, Wu Q, Xu W, et al. Clinical diagnosis of 8274 samples with 2019-novel coronavirus in Wuhan. *medRxiv*. 2020.02.12.20022327.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.12.20022327>
41. Batista A, Pacheco L G C. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR- based programmable nucleic acid binding proteins. *J Microbiol Methods*. 2018;152, 98-104.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.024>
42. Bhattacharyya RP, Thakku SG, Hung DT. Harnessing CRISPR effectors for infectious disease diagnostics. *ACS Infect Dis*. 2018;4(9):1278-82.
<https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.8b00170>
43. Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends Biotechnol*. 2019;37(7):730-43.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.005>
44. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006;4(7):1115-21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
45. Barrangou R. Nobel dreams come true for Doudna and Charpentier. *CRISPR J*. 2020;3(5):317-8.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2020.29109.rba>
46. Burmistrz M, Pyrc K. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. *Pol J Microbiol*. 2015;64(3):193-202.
<https://doi.org/10.5604/01.3001.0009.211>
47. Riordan SM, Heruth DP, Zhang LQ, Ye SQ. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries. *Cell Biosci*. 2015; 5:33.
<https://doi.org/10.1186/s13578-015-0027-9>
48. Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol*. 2015;100-11.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.002>
49. Fichtner F, Castellanos RU, Ulker B. Precision genetic modifications: A new era in molecular biology and crop improvement. *Planta*. 2014;239(4):921-39.
<https://doi.org/10.1007/s00425-014-2029-y>
50. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-78.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
51. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-7.
<https://doi.org/10.1038/nature13011>
52. Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synth Biol*. 2020;9(6):1226-33.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00507>
53. Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/Cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods. *Biosens Bioelectron*. 2020; 165:112430.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112430>
54. Berber B, Aydin C, Kocabas F, et al. Gene editing and RNAi approaches for COVID-19 diagnostics and therapeutics. *Gene Ther*. 2020;(Baskıda).
<https://doi.org/10.1038/s41434-020-00209-7>
55. U.S. Food & Drug Administration (FDA). Letter of authorization for SARS-CoV-2 RNA DETECTR assay. 2020.
[<https://www.fda.gov/media/139934/download>]. (Erişim tarihi: 21/01/2020)
56. U.S. Food & Drug Administration (FDA). Letter of authorization for Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 kit. 2020.
[<https://www.fda.gov/media/137747/download>]. (Erişim tarihi: 21/01/2020)
57. Yan W X, Hunnewell P, Alfonse L E, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*. 2019;363(6422):88-91.
<https://doi.org/10.1126/science.aav7271>
58. Chen J, Ma E, Harrington L, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018;360(6387):436-9.
<https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
59. Broughton JP, Deng W, Fasching CL, Singh J, Chiu C, Chen JS. A protocol for rapid detection of the 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR diagnostics: SARS-CoV-2 DETECTR.
[<https://mammoth.bio/wp-content/uploads/2020/03/Mammoth-Biosciences-A-protocol-for-rapid-detection-of-SARS-CoV-2-using-CRISPR-diagnostics-DETECTR.pdf>]. (Erişim Tarihi: 21/01/2021)
60. O'Connell MR. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas systems. *J Mol Biol*. 2019;431(1):66-87.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.029>
61. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017;356(6336):438-42.
<https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
62. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*. 2019;14(10):2986-3012.

<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>

63. Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. [[https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20\(updated\).pdf](https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20(updated).pdf)].
- (Erişim tarihi: 21/01/2020)
64. Arizti-sanz J, Freije CA, Stanton AC, et al. Integrated sample inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. bioRxiv. 2020.05.28.119131. <https://doi.org/10.1101/2020.05.28.119131>

Agarda Dilüsyon ve Deneme Aşamasındaki EUCAST Disk Difüzyon Yöntemi ile Saptanan *Bacteroides fragilis* Grubu İzolatlarına Ait Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Comparison of the Antimicrobial Susceptibility Results of *Bacteroides fragilis* Group Isolates Determined by Agar Dilution and the Tentative EUCAST Disk Diffusion Method

Semra Eminoğlu*[©], Bermal Tekeş*[©], 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: Eminoğlu S, Tekeş B, Sayın E, Ülger Toprak N. Agarda dilüsyon ve deneme aşamasındaki EUCAST disk difüzyon yöntemi ile saptanan *Bacteroides fragilis* grubu izolatlarına ait antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):109-18.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, yakın zamanda European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından anaeroplara için geliştirilen disk difüzyon testi ve Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI) tarafından anaerop bakteriler için önerilen standart, agarda dilüsyon yöntemleriyle enfeksiyon etkeni *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakterilerinin antimikrobiyallere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır, iki testin sonuçları arasında uyumluluk araştırılmıştır.

Yöntem: Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında, Ocak 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve MALDI-TOF MS ile tanımlanan 56 BFG izolatlarının ampisilin/sulbaktam, sefoksitin, imipenem, klindamisin, tigesiklin, moksifloksasin ve metronidazole duyarlılıkları koyun kanıyla zenginleştirilmiş Brucella agar kullanılarak agarda dilüsyon yöntemiyle, at kanı ile zenginleştirilmiş Fastidious Anaerobic Agar (FAA) besiyeri kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Bulgular: Batın içi absesi (n=24), kan (n=10) ve doku biyopsi örneği (n=11) gibi çeşitli klinik materyallerden izole edilen, çoğunluğu *Bacteroides fragilis* (n=34, %61) ve *Bacteroides thetaioaomicron* (n=11, %20) izolatlarından oluşan altı BFG türü tanımlanmıştır. Agarda dilüsyon yöntem sonuçlarına göre izolatlar üzerine en etkili antimikrobiyaller %98.2 duyarlılık oranlarıyla imipenem ve metronidazol olmuş, bunu sırasıyla %89.3 ve %66.1 oranlarıyla tigesiklin ve ampisilin/sulbaktam izlemiştir. Moksifloksasine duyarlı olanların oranı %57.1, klindamisine ise %46.4 bulunmuştur. İki yöntemin, izolatların antimikrobiyallere duyarlılık durumlarını belirleme performansları metronidazol için %100, imipenem ve tigesiklin için %89.8 uyumlu bulunmuştur. Diğer antibiyotikler için kabul edilebilir uyum saptanmamıştır.

Sonuç: BFG bakterilerinin metronidazol, imipenem ve tigesikline duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin; klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilir, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu söyleyebiliriz. Ancak, bir standardın oluşturulması adına, özellikle diğer antimikrobiyaller için daha fazla izolatın ele alındığı, deney koşullarının optimize edildiği çalışmaların gerektiğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: *Bacteroides fragilis* grubu bakteriler, agarda dilüsyon, disk difüzyon

ABSTRACT

Objective: In this study it was aimed to determine the antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group (BFG) bacteria using recently developed European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) disc diffusion method and agar dilution method recommended by Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI) for anaerobes and to investigate the agreement of the results of two tests.

Method: The antimicrobial susceptibilities of a total of 56 BFG strains isolated from clinical samples and identified by MALDI-TOF MS analysis between January 2017 and December 2018, were tested to ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefoxitin, imipenem, clindamycin, tigecycline, moxifloxacin and metronidazole MICs were determined by agar dilution method using sheep blood supplemented Brucella agar and disk diffusion test using host blood supplemented Fastidious Anaerobic Agar (FAA).

Results: Six different BFG species consisting mostly strains of *Bacteroides fragilis* (n=34, 61%) and *Bacteroides thetaioaomicron* (n=11, 20%) isolated from various clinical samples such as intraabdominal abscess (n= 24), blood (n=10) and tissue biopsy samples (n=11).were identified. Imipenem and metronidazole were the most effective antimicrobials with 98.2% susceptibility rates, followed by tigecycline, ampicillin/sulbactam, moxifloxacin and clindamycin with susceptibility rates of 89.3%, 66.1%, 57.1% and 46.4%, respectively. Most concordant results were obtained with metronidazole (100%), imipenem (89.8%) and tigecycline (89.8%). Acceptable compliance rates were not found for other antimicrobials.

Conclusion: We can say that disc diffusion method is a fast, easy-to-apply, and reliable method used in clinical microbiology laboratories to determine the susceptibility of BFG bacteria to metronidazole, imipenem and tigecycline. However, to evolve a standard method especially for other antimicrobials, the experimental conditions should be optimized with studies done with greater number of isolates.

Keywords: *Bacteroides fragilis* group bacteria, agar dilution method, disc diffusion method

Alındığı tarih / Received:

15.09.2020 / 15.September.2020

Kabul tarihi / Accepted:

10.11.2020 / 10.November.2020

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

S. Eminoğlu 0000-0002-2541-2496

B. Tekeş 0000-0003-4511-4709

E. Sayın 0000-0002-1320-1704

N. Ülger Toprak 0000-0002-9766-5978

✉ nulger@marmara.edu.tr

GİRİŞ

Bacteroides fragilis grubu (BFG) bakteriler zorunlu anaerob gram negatif çomaklardır. Kolon mikrobiyotasının önemli kısmını oluştururlar. Cerrahi girişim veya travmaya bağlı bağırsak mukoza bütünlüğünün bozulduğu, bağışık yanıtın baskılandığı durumlarda vücudun diğer bölgelerine yayılarak ciddi seyirli, hatta ölümlü sonlanan fırsatçı enfeksiyonlara neden olabirler⁽¹⁾. BFG bakteriler, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides vulgatus* ve *Bacteroides thetaiotaomicron* gibi *Bacteroides* türlerinden ve *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii* ve *Parabacteroides merdae* gibi *Parabacteroides* türlerinden [<https://lpsn.dsmz.de/genus/bacteroides>] oluşur. Türler arasında birtakım farklılıklar bulunmakla beraber, BFG bakteriler yüksek virülans özelliklere sahiptirler ve anaerob bakteriler arasında enfeksiyonlara en fazla yol açan organizmalardır. Bu bakteriler aynı zamanda diğer anaerob bakterilere göre antibiyotiklere daha fazla dirençlidirler⁽¹⁾.

BFG bakterileri vankomisin, kanamisin, kolistin, aztreonam, aminoglikozitler ve trimetoprim- sülfametoksazol antibiyotiklerine doğal dirençlidirler⁽²⁾. İzolatların çoğu penisilinlere, tetrasiklinlere yüksek oranda direnç kazanmışlardır. Bunun yanı sıra klindamisin, moksifloksasin gibi anaerob enfeksiyonların tedavisinde kullanılan birçok antibiyotiğe artan oranda direnç geliştirdikleri saptanmıştır. BFG bakterileri üzerine etkili olabilecek β -laktam/ β -laktamaz inhibitörleri, karbapenemler, tigesiklin, kloramfenikol ve metronidazol gibi az sayıda antibiyotik vardır⁽³⁻⁶⁾. Ancak, son yıllarda BFG bakterilerinin bu antibiyotiklere de direnç geliştirdikleri, aynı zamanda çok antibiyotiğe direnç sergiledikleri ve yüksek oranda mortaliteye yol açtıkları bildirilmiştir^(7,8).

Gerek ülkemizde gerekse dünya genelinde mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğunda anaerobların, dolayısıyla BFG bakterilerinin kültürleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları rutin olarak çalışılmaz⁽²⁾. Bunun önemli nedenlerinden birisi, anaerob bakterilerin duyarlılıklarını belirlemek için önerilen agarda dilüsyon testinin, rutin mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanabi-

lecek pratik bir yöntem olmamasıdır⁽⁹⁾. Günümüzde güvenilir, hızlı, laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir yöntem geliştirme arayışları vardır. Çalışmalardan birisi European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'in geliştirmekte olduğu disk difüzyon yöntemiyle BFG bakterilerinde duyarlılık testidir⁽¹⁰⁾. Çalışmanın sonuçları BFG bakterilerde, belirli antibiyotikler için disk difüzyon testinin günlük laboratuvar uygulamalarında güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. Bir standart oluşturmak ve bir rehber hazırlamak adına optimizasyon çalışmaları sürdürülmektedir.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda, klinik materyallerden izole edilmiş BFG bakterilerinin EUCAST'ın geliştirmekte olduğu disk difüzyon yöntemi ve anaerob bakteriler için önerilen standart, agarda dilüsyon yöntemi ile duyarlılıklarının belirlenmesi, elde edilen sonuçlara göre disk difüzyon yönteminin laboratuvarımızda rutinde uygulanabilirliği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatların belirlenmesi: Çalışmamıza, Ocak 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen, enfeksiyon etkeni BFG bakterileri dâhil edilmiştir. Klinik örnekler genel cerrahi (n=17), iç hastalıkları (n=9), kadın hastalıkları (n=6), yoğun bakım servisleri (n= 5), acil servis (n=5), enfeksiyon hastalıkları (n=4) ve diğer kliniklerden gönderilmiştir. Örnekler 53 hastadan alınmış, çoğu batın içinden olmak üzere apselerden (n=26), dokudan biyopsi örneklerinden (n=10), kan (n=10) ve diğer vücut sıvılarından oluşmuştur. Birer plevra, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve dokudan biyopsi örneklerinden ikişer farklı BFG türü olmak üzere üretilen toplam 56 BFG izolatı çalışmaya alınmış, yineleyen üremelerden birisi çalışmaya dâhil edilmiştir. Tanımlanan izolatlar -80°C'de saklanmıştır. Duyarlılık testi yapılabildiği zaman, bakterilerin canlandırılması için zenginleştirilmiş Brucella agarda (%5 koyun kanı, K vitamin; 1 µg/ml ve hemin; 5 µg/ml bulduran) üç kez ardışık olarak anaerob ortamda (Bactron-I, SHELLAB, ABD) kültürleri yapılmıştır.

İzolatların tanımlanması: Aerotolerans testiyle sadece anaerop ortamda üreyebilen, Gram negatif boyanma özelliğine sahip, identifikasyon amaçlı kullanılan kolistin (10 µg), vankomisin (5 µg) ve kanamisin (1000 µg) disklerine dirençli, safralı besiyerinde üreyebilen, hareketsiz, katalaz aktivitesi gösteren basiller BFG bakteri olarak değerlendirilmiştir⁽¹¹⁾. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. Sistemin kullanım kılavuzu önerilerine uygun olarak birer koloniden hazırlanan preparatlar lazer atışlarına maruz bırakılmış ve elde edilen kütle spektromları VITEK® MS'in (bioMérieux, Fransa) V3.0 bilgi veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakteri tanımlanmıştır. Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlanma kontrolü ATCC *Escherichia coli* 8739 izolatu ile yapılmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri: Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler; Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI) ve EUCAST önerileri dikkate alınarak seçilmiştir^(12,13). İzolatların ampisilin, ampisilin/sulbaktam, sefoksitin, imipenem, tigesiklin, klindamisin, moksifloksasin ve metronidazole (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ABD) duyarlılık durumları agarda dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle belirlenmiştir^(10,12). Kontrol olarak ATCC 25285 *Bacteroides fragilis* izolatu kullanılmıştır.

Agarda dilüsyon yöntemi: Agarda dilüsyon yönteminde CLSI (M11-A7) önerilerine uygun şekilde, antibiyotiklerin yarı yarıya sulandırılmalarıyla hazırlanmış, hemin, K vitamini ve %5 koyun kanı bulunduran Brucella agar kullanılmıştır⁽¹²⁾. K vitamini ve heminle zenginleştirilmiş Brucella sıvı besiyerlerinde bir gecelik inkübasyonla elde edilmiş bakteri kültürü 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde ayarlanmış, 1/10 oranında sulandırılmıştır. Bakteri süspansiyonundan 10'ar µl önceden hazırlanmış antibiyotikli besiyerlerine damlatılarak inoküle edilmiştir. Her bir plakta 25 izolat bulunacak şekilde inokülasyon işlemleri tamamlandıktan sonra plaklar 37°C'de 48 saat anaerop ortamda (Bactron-I, SHELLAB, ABD) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir⁽¹²⁾. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık durumu EUCAST klinik sınır değerlerine göre

yorumlanmıştır⁽¹³⁾. EUCAST klinik sınır değeri bulunmayan antibiyotikler için CLSI sınır değerleri kullanılmıştır. EUCAST ve CLSI'nın sınır değer bildirmediği tigesiklin için 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⁽¹⁴⁾.

Disk difüzyon metodu: Disk difüzyon metodu için; ampisilin (10 µg), ampisilin/sulbaktam (10/10 µg), sefoksitin (30 µg), imipenem (10 µg), tigesiklin (15 µg), klindamisin (10 µg), moksifloksasin (5 µg) ve metronidazol (5 µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, Birleşik Krallık) kullanılmıştır⁽¹⁰⁾. Besiyeri olarak EUCAST tarafından kullanılması üzerinde uzlaşmaya varılan Fastidious Anaerobe Agar (FAA) (LabM, Birleşik Krallık) çalışmaya alınmıştır⁽¹⁵⁾. Yüzde 5 oranında at kanı ile zenginleştirilmiş FAA, kalınlığı 4 mm olacak şekilde plaklara aktararak kurumaya bırakılmıştır. Diğer yandan bir gecelik inkübasyon sonrası FAA'dan elde edilen taze kültürden %0.9'luk tuzlu su içinde McFarland 1 bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmış, steril pamuklu eküvyon ile taze FAA'a, plağın tüm yüzeyine eşit yayılacak şekilde ekim yapılmıştır. Her bir 90 mm ebatlarındaki FAA plağına penset kullanılarak en fazla üç adet antibiyotik diski yerleştirilmiştir. İnokulum hazırlanması, ekim işleminin yapılması ve antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi EUCAST'in önerdiği 15'er (15-15-15) dakika kuralına göre bekletilmeden uygulanmıştır⁽¹⁰⁾. İşlemleri tamamlanan plaklar karanlık (besiyeri üreten firmanın önerisine istinaden) ve anaerop ortamda 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin çevresindeki üreme olmayan zon çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüş, daha önce yapılan çalışmalardan bildirilmiş sonuçlarla karşılaştırılmış, izolatlarımızın ilgili antibiyotiğe duyarlı (S) ve dirençli (R) olabileceği şeklinde çıkarımlar yapılmıştır. Agarda dilüsyon test sonuçları ile disk difüzyon test sonuçları karşılaştırılarak aralarında bağlantı bulmaya çalışılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada, 53 hastanın çeşitli klinik örneklerinden üretilmiş 56 BFG izolatu ele alınmıştır. İzolatların

Tablo 1. İzolatların elde edildikleri klinik örnekler göre dağılımı.

BFG bakteriler	Apse	BAI*	Doku	BOS**	Periton sıvısı	Plevra sıvısı	Toplam Sayı (n)
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	15	8	2	2	0	34
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0	4	0	1	1	2	11
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1	2	1	0	0	0	4
<i>Bacteroides ovatus</i>	0	0	1	0	0	1	2
<i>Bacteroides uniformis</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0	3	0	0	0	0	4
Toplam Sayı (n)	2	24	11	3	3	3	56

*BAI: Batın içi apse, **BOS: Beyin omurilik sıvısı

Tablo 2. BFG izolatlarının antimikrobiyallere duyarlılık durumları.

Antimikrobiyaller	Sınır değerleri ^a			MİK değerleri (µg/ml)			Duyarlılık profili (%)		
	Hassas	Orta	Dirençli	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Hassas	Orta	Dirençli
Ampisilin	≤0,5		>2	4->256	64	>258	0		100
Ampisilin/sulbaktam	≤4	32	>8	<0.125->64	2	16	66.1		33.9
Sefoksitin ^b	≤16		≥64	4->64	32	>64	68	16	16
İmipenem	≤2		>8	<0.06-64	0.05	2	98.2		1.8
Klindamisin	≤4	8	>4	0.25->256	16	>256	46.4		53.6
Tigesiklin ^c	≤4	4	≥16	0.25-16	1	8	89.3	8.9	1.8
Moksifloksasin ^b	≤2		≥8	0.05->64	4	32	57.1	12.5	30.4
Metronidazol	≤4		>4	0.5-8	0.05	2	98.2		1.8

^aEUCAST klinik sınır değerlerine göre, ^bCLSI klinik sınır değerlerine, ^cFDA klinik sınır değerlerine göre yorumlanmıştır.

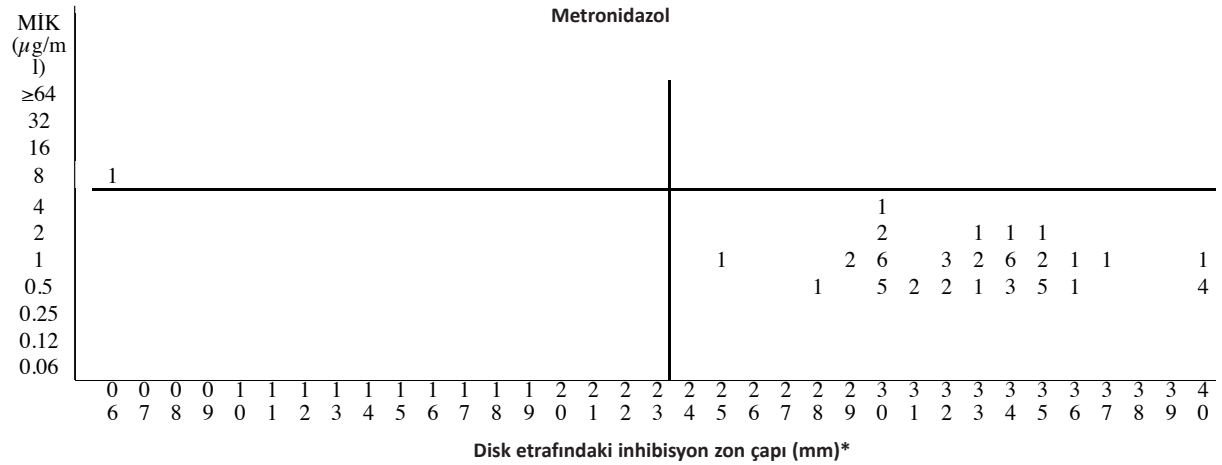
çoğunluğunu *B. fragilis* (n=34, %61), oluşturmuş bunu sırasıyla *B. thetaiotaomicron* (n=11, %20), *B. vulgatus* (n=4), *P. distasonis* (n=4), *B. ovatus* (n=2) ve *B. uniformis* (n=1) izlemiştir. İzolatlarımızın klinik örnekler göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Agarda dilüsyon test sonuçlarımıza göre izolatlarımızın tamamı ampisiline, %33.9'u ampisilin/sulbaktama, %16'sı ise sefoksitine dirençli bulunmuştur. Orta dirençli olanlar da değerlendirmeye katıldığında sefoksitine duyarlı olmayanların oranı %32'ye yükselmiştir. İkinci en yüksek direnç oranı klindamisine karşı (%53.6) saptanmış, bunu %30.4 (orta dirençliler ile birlikte toplam %42.9 oranında duyarlı olmayanlar) oranıyla moksifloksasine direnç izlemiştir. İzolatlar üzerine en etkili görülen antibiyotikler %1.8 direnç oranlarıyla imipenem, metronidazol ve tigesiklin olmuştur.

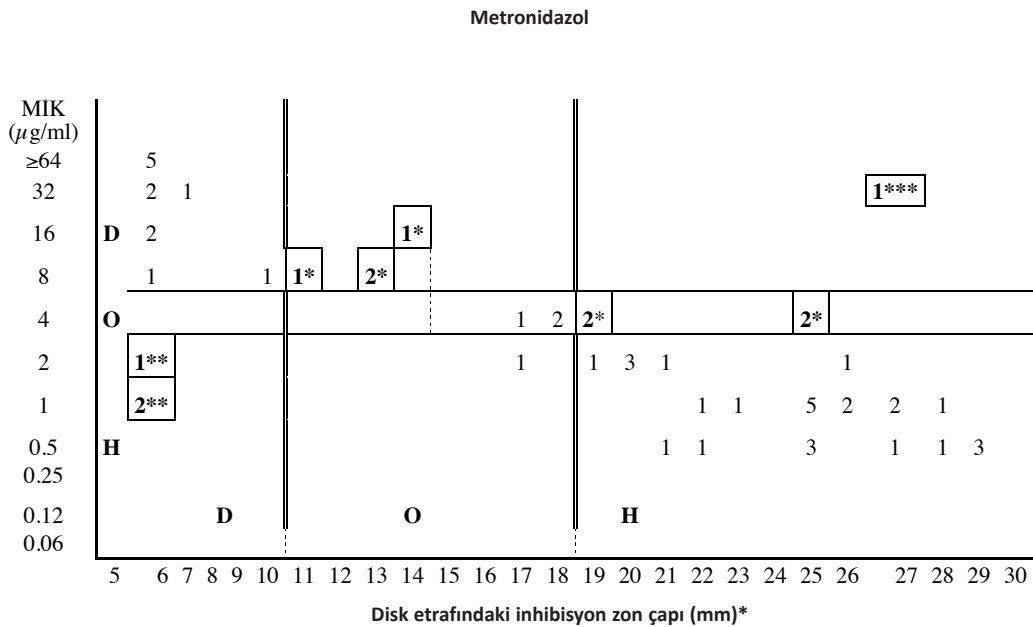
İzolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ve CLSI, EUCAST

ve FDA'nın klinik sınır değerlerine göre belirlenmiş antibiyotiklere duyarlılık durumları Tablo 2'de verilmiştir.

Disk difüzyon test sonuçları 24 saatlik inkübasyon sonunda disk etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Bakterilerin iyi üredikleri, zon çaplarının düzgün ve net bir şekilde görülebilir olduğu saptanmıştır. Daha önce duyarlılık zon sınır değerleri belirlenen antibiyotiklere (duyarlılık kriterleri; imipenem ≥29 mm, metronidazol ≥24 mm, klindamisin ≥25, moksifloksasin ≥19 mm) göre agarda dilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarımızın uyumluluğu araştırılmıştır. Metronidazol için agarda dilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarımızda %100 oranında uyumluluk saptanmış ve her iki test ile izolatlar hassas ya da dirençli olarak bulunmuştur. İki test sonuçları arasındaki uyumluluk diğer antibiyotiklerden imipenem için %89, klindamisin için %78.5 ve moksifloksasin için %76.7 olarak saptanmıştır. Uyum oranı daha



Şekil 1. BFG izolatlarının metronidazole karşı MİK değerleri ve aynı izolatların metronidazol diski (5 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zonu ölçümlerinin dağılım şeması.
*inhibisyon zonu çapını gösteren 06-40 rakamları alt alta yazılmıştır.



Şekil 2. BFG izolatlarının moksifloksasine karşı MİK değerleri ve aynı izolatların moksifloksasin diski (5 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zonu ölçümlerinin dağılım şeması.
*Küçük hata, **Büyük hata, ***Çok büyük hata veren izolatlar. D; dirençli, O; orta dirençli, H; hassas

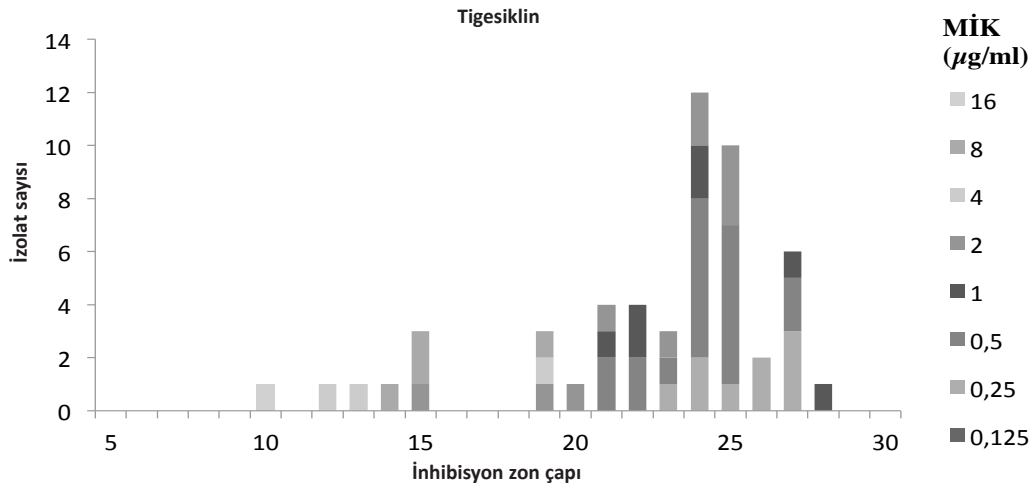
düşük olan klindamisin ve moksifloksasin için tür bazında zonu çapında belirgin farklılıkların olduğu gözlenmiştir (Tablo 3'te BFG izolatlarının tür bazında moksifloksasine göstermiş oldukları inhibisyon zonu çapları yer almaktadır). Ampisilin/sulbaktam ve sefoksitine duyarlılık sonuçlarında pek kıyaslanabilir değerler bulunamamış, aynı MİK değerlerine sahip izolatlar farklı inhibisyon zonu çapları veya aynı zonu çaplarına sahip izolatlar farklı MİK değerleri sergile-

yebilmişlerdir. Tigesiklin için disk difüzyon inhibisyon zonu çaplarıyla ilgili henüz sınır değerler belirlenmediğinden iki yöntemin sonuçları karşılaştırılamamıştır. Ancak, MİK değerlerine göre duyarlı izolatların (n=50) %92'sinde disk difüzyon testiyle inhibisyon zonu çapı 19 mm ve üzerinde bulunmuş, %8'inde ise 12 ile 15 mm arasında veriler elde edilmiştir. MİK sonucuna göre dirençli tek izolat ise 10 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuştur (Şekil 3a, 3b).

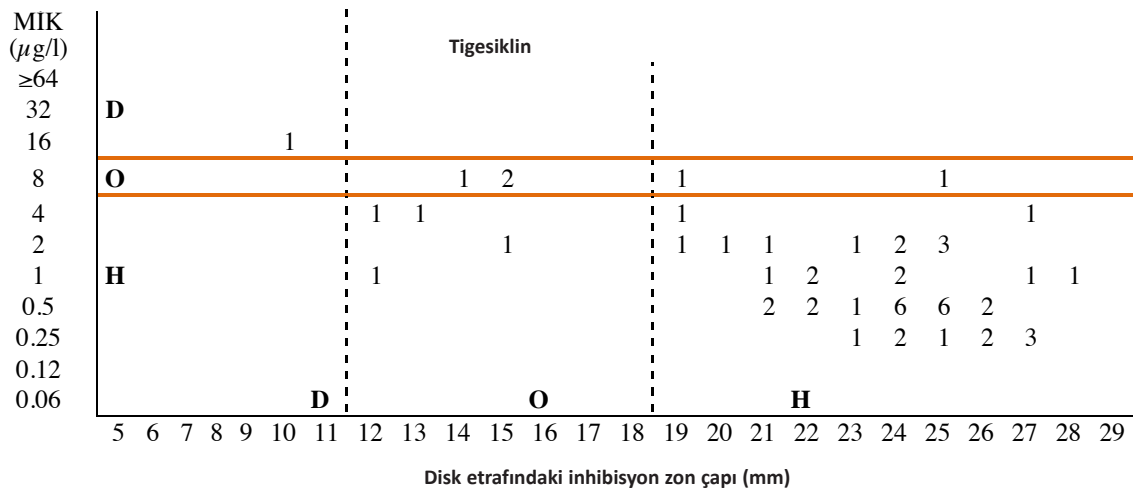
Tablo 3. Şekil 2'deki verilen BFG izolatlarının moksifloksasine karşı disk difüzyon inhibisyon zon çap ölçümlerinin MİK değerlerine göre dağılımı.

MİK (µg/l)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)
0.5	7	21, 25, 25, 28, 29, 29, 29	1	27	2	22, 25	0	-
1	12	6**, 6**, 22, 23, 25, 25, 25, 26, 26, 27, 27, 28	0	-	0	-	2	25, 25
2	2	6**, 27	4	19, 20, 20, 21	0	-	2	20, 17
4	4	17, 18, 19*, 19*	2	15, 25	1	18	0	-
8	5	6, 10, 11*, 13*, 13*	0	-	0	-	0	-
16	2	6, 14*	0	-	1	6	0	-
32	2	6, 27***	2	6, 7	0	-	0	-
≥64	0	-	2	6, 6	0	-	3	6, 6, 6

*Küçük hata, **Büyük hata, ***Çok büyük hata veren izolatlar



Şekil 3a. BFG izolatlarının tigesikline karşı MİK değerleri ve aynı izolatların tigesiklin diski (15 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması.



Şekil 3b. BFG izolatlarının tigesikline karşı MİK değerleri ve aynı izolatların tigesiklin diski (15 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması. Tigesiklin için disk diffüzyon inhibisyon zon çaplarıyla ilgili henüz belirlenmiş sınır değerler bulunmamaktadır. Verilerimize göre tigesiklin için önerilmesi muhtemel sınır değerleri; "≥19'lar hassas, <12'ler dirençli" olabilir.

D; dirençli, O; orta dirençli, H; hassas

TARTIŞMA

İzolasyonunun ve tanımlanmasının zor, zahmetli ve pahalı olması nedeniyle gerek dünyada gerekse ülkemizde çok az laboratuvar da anaerop bakteri kültürü yapılmaktadır. Anaeroplara bağlı enfeksiyon varlığında antianaerop etkiye sahip olduğu düşünölen antibiyotikler ile ampirik tedavi uygulanmaktadır⁽²⁾. Ancak, son yıllarda giderek artan antibiyotik direnci nedeniyle anaerop bakterilerin, özellikle BFG izolatlarının duyarlılıkları öngörülemez hâle gelmiştir. Ülkelere, şehirlere, merkezlere hatta aynı merkezde farklı kliniklere göre değişiklik göstermekle beraber çalışmalar, karbapenem, piperasilin/ tazobaktam, amoksisilin/klavulanik asit ve metronidazol gibi en aktif antibiyotiklere bile direnç geliştirdiğini göstermiştir^(3,4). Çok ilaca dirençli BFG izolatlarına bağlı olgu bildirimlerinde belirgin bir artış dikkat çekmektedir^(7,8). Bu gelişmeler günlük rutin laboratuvar uygulamalarında, anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarını belirleyen testlere duyulan gereksinimin büyüklüğünü gözler önüne sermektedir⁽⁹⁾.

Anaerop bakteriler için önerilen duyarlılık testi; agarda dilüsyon metodu, klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin stoklanıp biriktirilerek antibiyotik duyarlılıklarının toplu çalışılması için uygun bir yöntemdir. Rutin laboratuvar uygulamaları için pratik bir yöntem değildir⁽¹²⁾. Alternatif bir yöntem olarak anaeroplara uyarlanan, özel durumlarda, seçilmiş birkaç antibiyotik için kullanılabilen gradyan strip testi (E-testi) ise pahalıdır, düşük gelirli ölkelerdeki laboratuvarlarda düzenli olarak kullanılması mümkün değildir⁽¹⁶⁾. Günümüzde rutin laboratuvar uygulamalarında, anaerop bakteriler için kullanılacak ucuz, basit ve güvenilir sonuçlar veren duyarlılık yöntemi arayışları sürmektedir. Aerop bakteriler için kullanılan disk difüzyon yönteminin *Clostridiodes difficile* ve BFG bakteriler gibi çabuk üreyen organizmaların duyarlılıklarını belirlemede çözüm olabileceği düşünölmüş ve bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Erikstrup ve ark.⁽¹⁷⁾, hastanede yatan ishaller hastalardan izole edilmiş, gradyan strip testi ile metronidazol veya vankomisine duyarlılığı azalmış, moksifloksasin veya rifaksimine dirençli olduğu saptanan *C. difficile* izo-

latlarının disk difüzyon yöntemiyle aynı antibiyotiklere duyarlılıklarını araştırmışlar, iki yöntem sonuçları arasında kusursuz bir uyum saptamışlardır. Aynı çalışma grubu, rutin laboratuvar uygulamalarında disk difüzyon yönteminin *C. difficile* izolatlarının duyarlılığını belirlemede kullanılabileceğini deneyimlemiştir⁽¹⁸⁾.

Bacteroides izolatlarının duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin uygunluğunu saptamak için kapsamlı bazı çalışmalar yapılmıştır. Çeşitli besiyerleri, inkübasyon koşulları denenmiş, EUCAST'ın anaeroplara için belirlediği sınır değerler kullanılarak yapılan ilk karşılaştırmalı çalışma, 2013 yılında ECCMID Kongresinde sunulmuştur⁽¹⁹⁾. Toplam 104 BFG izolatının ele alındığı, besiyeri olarak koyun kanı, hemin ve K vitaminiyle zenginleştirilmiş Brucella agar, antibiyotiklerden piperasilin /tazobaktam, meropenem, klindamisin ve metronidazol antibiyotik disklerinin kullanıldığı bu çalışmada agarda dilüsyon MİK değerleriyle uyumlu sonuçlar alınmıştır. Nagy ve ark.⁽¹⁰⁾ tarafından yapılan, daha geniş bir bakteri topluluğu (n=381) ve dokuz antibiyotiğin ele alındığı, koyun kanlı Brucella agarın kullanıldığı çalışmada, disk difüzyon duyarlılık testinin günlük rutin laboratuvar çalışmalarında uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Uyumlu sonuçlar alınmakla beraber, deney koşullarıyla ilgili optimizasyon sürmektedir^(20,21). Bakterilerin üremesini daha fazla arttırdığı, piyasada daha kolay bulunabilir olduğu savıyla koyun kanıyla zenginleştirilmiş Brucella agar yerine at kanı eklenmiş FAA kullanılması kararlaştırılmış ve son çalışmalar at kanıyla zenginleştirilmiş FAA besiyeriyle alınan sonuçlara yoğunlaştırılmıştır⁽²²⁾.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş BFG bakterilerinin duyarlılıkları at kanıyla zenginleştirilmiş FAA kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiş, anaeroplara için standart yöntem olan agarda dilüsyon testiyle elde edilen MİK değerleriyle karşılaştırılmıştır. Antibiyotik diskleri, CLSI ve EUCAST klavuzlarında önerilen gram negatif anaerop bakterilerin duyarlılıklarını belirlemek için kullanılan antibiyotiklere göre seçilmiştir. Çalışmanın bütün basamaklarında inokölüm miktarından, besiyeri kalınlığına, inkübasyon sıcaklığı ve süresinden ve karanlık

ortamda tutulmasına kadar önerilen konulara titizlikle uyulmuştur. Testlerin değerlendirme aşamasında, inkübasyon sonrasında iyi üreme ve antibiyotik diskleri etrafında net inhibisyon zonları saptanmıştır.

İki duyarlılık testi arasındaki en yüksek benzer sonuçlar, %100 uyumla metronidazol ile yaklaşık %90 uyumla imipenem ile alınmıştır. Bu iki antibiyotikle uyumlu sonuçların alınması önemlidir. Bakteriyemi gibi invaziv enfeksiyonlarda tercih edilecek bakterisidal antibiyotikler karbapenemler ve metronidazoldür^(22,23). Günümüzde kullanılan kan kültür cihazlarıyla kanda üreme kısa sürede belirlenebilmektedir. Anaerob kültür pratiği olan laboratuvarlarda, üremeli kan kültür şişesinden yapılan ekimden 24 saatlik inkübasyon sonrası BFG bakteri kültürü elde edilebilmektedir⁽²⁴⁾. Kültürden yapılan disk difüzyon testiyle bakterilerin bu antibiyotiklere duyarlılıkları belirlenebilecektir. Hastanemizde karbapenemlere dirençli *Bacteroides* oranı diğer ülkelerdeki direnç oranlarına göre daha yüksektir⁽²⁵⁾. Bunun yanı sıra hastanemizde metronidazole dirençli *Bacteroides*'lere bağlı bakteriyemi olguları da saptanmıştır⁽²⁶⁾. Özellikle bakteriyemi etkeni BFG bakterilerinin kısa sürede tanımlanması, metronidazole ve imipeneme duyarlılıklarının belirlenmesi tedavinin başarılı olmasında önemlidir^(22,23).

İzolatlarımız üzerine imipenem ve metronidazolden sonra en etkili antimikrobiyallerden tigesiklin için disk difüzyon inhibisyon zon çapıyla ilgili henüz belirlenmiş sınır bir değer bulunmadığı için iki test arasındaki uyum hesaplanamamıştır. Verilerimize göre tigesiklin için önerilmesi muhtemel sınır değerlerinin "≥19 mm hassas, 18-12 mm orta dirençli ve <12'ler dirençli" olabileceğini düşünüyoruz (Şekil 3a, 3b). Bu değerler baz alındığında MİK değerleri ile disk difüzyon test sonuçları arasında %89.3 oranında uyum, %10.3 oranında minor hata (agar dilüsyon yönteminde duyarlı olup, disk difüzyon testiyle orta dirençli olanlar n=2, agar dilüsyon yönteminde orta dirençli olup, disk difüzyon testiyle duyarlı olanlar n=4) varlığından söz edebiliriz. Bu değerlendirmeye göre büyük hata veya çok büyük hatanın olmaması, tigesiklin için disk difüzyon testinin kullanılabilmesini düşündürmektedir.

Diğer antibiyotiklerden klindamisin ve moksifloksasin ile yapılan testlerde %75'ten daha yüksek oranda uyum gözlenmiştir. Ancak, bu oran kabul edilir (≥90) orandan düşüktür ve rutin laboratuvar pratiğinde kullanılması olası değildir. Tür düzeyinde değerlendirildiğinde, iki test arasındaki uyum oranı da değişiklik göstermektedir. Örneğin, moksifloksasin için küçük hata, büyük hata ve çok büyük hata veren izolatların daha çok *B. fragilis* türleri arasında yer aldığı görülmektedir. Çok sayıda bakterinin ele alındığı, özellikle tür düzeyinde yapılacak çalışmalar ile disk difüzyon testinin bu antibiyotikler için optimize edilmesi gereklidir. Gerek dünyada gerekse ülkemizde bu antimikrobiyallere yüksek oranda direnç bulunmaktadır, duyarlılık sonuçları saptanmadan ampirik tedavide kullanılmaları önerilmemektedir^(4-6,27-30). Bu nedenle BFG izolatlarının klindamisin ve moksifloksasine duyarlılıklarının belirlenmesi uygun antimikrobiyalin seçilmesinde önemlidir.

Ampisilin/sulbaktam ve sefoksitin diskleriyle yapılan çalışmalar pek tutarlı sonuçlar vermemiştir. Aynı MİK değerine sahip bazı organizmalar farklı disk inhibisyon zonu oluştururken, aynı disk zonu çapına sahip organizmalar farklı MİK değerleri göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalarda da beta-laktam grubu antibiyotiklerin benzer sonuçlar sergiledikleri belirtilmiştir^(10,15,21).

Test edilen izolat sayısının az olması çalışmamızın zayıf tarafını oluşturmaktadır. Daha fazla bakteriyi dâhil ederek optimize edilen çalışmalar ile bu eksikliklerin giderileceğine inanıyoruz. Bu zayıf tarafına karşın ileride yapacağımız çalışmalara kaynak oluşturması bakımından verilerimizin değerli olduğunu düşünüyoruz.

Sonuç olarak, BFG bakterilerinin, bu bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılan antimikrobiyallerden metronidazol, imipenem ve tigesikline duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin kolaylıkla uygulanabilir, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu söylenebilir. Ancak, bir standardın oluşturulması adına, özellikle diğer antimikrobiyaller için daha fazla izolatin ele alındığı, deney koşullarının optimize edildiği çalışmaların yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Teşekkür

Disk difüzyon testinde kullanmamız için bize FAA besiyerini hediye eden İŖveçli bilim insanı Prof. Dr. Erika Matuschek'e (EUCAST Geliştirme Laboratuvarı, Växjö Merkez Hastanesi Växjö, İŖveç) teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun, 17.12.2018 tarih ve 254 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Finansal Destek: Bu çalışma, Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-100719-0261 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Marmara University Ethics Committee (12.17.2018-254).

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

Funding: Marmara University Scientific Research Projects Unit (Project No. SAG-C-YLP-100719-0261).

KAYNAKLAR

1. 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>
2. 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>
3. 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>
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. 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>
6. Nagy E, Urbán E, Nord CE, et al. 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>
7. SÓki J, Hedberg M, Patrick S, et al. Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. J Antimicrob Chemother. 2016;71(9):2441-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw175>
8. Merchan C, Parajuli S, Siegfried J, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Rahimian J. Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* bacteremia in a US resident: An emerging challenge. Case Rep Infect Dis. 2016; 2016:3607125. <https://doi.org/10.1155/2016/3607125>
9. 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>
10. Nagy E, Justesen US, Eitel Z, et al. Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. Anaerobe. 2015;31:65-71. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.10.008>
11. Nagy E, Boyanova L, Justesen US, et al. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories, Clin Microbiol Infect. 2018;24(11):1139-48. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.008>
12. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standards-7th Edition, M11-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, ABD, 2007.
13. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical breakpoints 2017. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
14. Tygacil®, 2010 Federal Drug Administration, Product Information, Pfizer Inc., Collegeville, PA, ABD.
15. Bavelaar B, Matuschek E, Morris T, et al. Performance of a new EUCAST disk diffusion method using fastidious anaerobe agar (FAA) for clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21-24 Nisan 2018, Madrid, İspanya: P0161.
16. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ, Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria, J Clin Microbiol. 1991;29(10):2197-203. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.10.2197-2203.1991>
17. Erikstrup LT, Danielsen TK, Hall V, et al, Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. Clin Microbiol Infect. 2012;18(8): E266-72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03907.x>

18. Holt HM, Danielsen TK, Justesen US. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(11): 2243-6.
<https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>
19. Luu H, Thomsen MD, Hansen F, Citron DM, Kahlmeter G, Justesen US. Disc diffusion antimicrobial-susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group using EUCAST clinical minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 27-30 April 2013, Berlin, Almanya: P1577.
20. Dubreuil L, Members of the CA-SFM 2019. Improvement of a disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria, French recommendations revisited for 2020. *Anaerobe.* 2020;64:102213.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102213>
21. Ho PL, Yau CY, Ho LY, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group organisms in Hong Kong by the tentative EUCAST disc diffusion method. *Anaerobe.* 2017;47:51-6.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.04.005>
22. Bavelaar H, Justesen US, Morris T, Kahlmeter G, Matuschek E. Development of a EUCAST disk diffusion method for rapidly growing anaerobic bacteria using fastidious anaerobe agar (FAA). 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21-24 Nisan 2018, Madrid, İspanya: P0160.
23. Kim J, Lee Y, Park Y, et al. Anaerobic bacteremia: Impact of inappropriate therapy on mortality. *Infect Chemother.* 2016;48(2):91-8.
<https://doi.org/10.3947/ic.2016.48.2.91>
24. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, et al, Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis.* 2000;30(6):870-6.
<https://doi.org/10.1086/313805>
25. Toprak NU, Uzunkaya OD, Ski J, Soyletir G. Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (cfiA) and metronidazole (nim) among *Bacteroides* species in a Turkish University Hospital. *Anaerobe.* 2012;18(1):169-71.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.004>
26. Toprak lger N, Sayın E, Soyad A, Dane F, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen ilk metronidazole dirençli *Bacteroides* kökeni: *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(4):717-21.
<https://doi.org/10.5578/mb.5064>
27. 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>
28. DoĒan M, Baysal B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):211-9.
29. Demir C, Keli R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen gram-negatif anaerop 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>
30. Demirci M, Gemicioglu B, Saribas S, et al. A retrospective analysis of anaerobic bacteria isolated in 236 cases of pleural empyema and their prevalence of antimicrobial resistance in Turkey. *Clin Lab.* 2018;64(7):1269-77.
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180317>

GİRİŞ

Bacteroides fragilis grubu (BFG) bakteriler zorunlu anaerob gram negatif çomaklardır. Kolon mikrobiyotasının önemli kısmını oluştururlar. Cerrahi girişim veya travmaya bağlı bağırsak mukoza bütünlüğünün bozulduğu, bağışık yanıtın baskılandığı durumlarda vücudun diğer bölgelerine yayılarak ciddi seyirli, hatta ölümlü sonlanan fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilirler⁽¹⁾. BFG bakteriler, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides vulgatus* ve *Bacteroides thetaiotaomicron* gibi *Bacteroides* türlerinden ve *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii* ve *Parabacteroides merdae* gibi *Parabacteroides* türlerinden [<https://lpsn.dsmz.de/genus/bacteroides>] oluşur. Türler arasında birtakım farklılıklar bulunmakla beraber, BFG bakteriler yüksek virülans özelliklere sahiptirler ve anaerob bakteriler arasında enfeksiyonlara en fazla yol açan organizmalardır. Bu bakteriler aynı zamanda diğer anaerob bakterilere göre antibiyotiklere daha fazla dirençlidirler⁽¹⁾.

BFG bakterileri vankomisin, kanamisin, kolistin, aztreonam, aminoglikozitler ve trimetoprim- sülfametoksazol antibiyotiklerine doğal dirençlidirler⁽²⁾. İzolatların çoğu penisilinlere, tetrasiklinlere yüksek oranda direnç kazanmışlardır. Bunun yanı sıra klindamisin, moksifloksasin gibi anaerob enfeksiyonların tedavisinde kullanılan birçok antibiyotiğe artan oranda direnç geliştirdikleri saptanmıştır. BFG bakterileri üzerine etkili olabilecek β -laktam/ β -laktamaz inhibitörleri, karbapenemler, tigesiklin, kloramfenikol ve metronidazol gibi az sayıda antibiyotik vardır⁽³⁻⁶⁾. Ancak, son yıllarda BFG bakterilerinin bu antibiyotiklere de direnç geliştirdikleri, aynı zamanda çok antibiyotiğe direnç sergiledikleri ve yüksek oranda mortaliteye yol açtıkları bildirilmiştir^(7,8).

Gerek ülkemizde gerekse dünya genelinde mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğunda anaerobların, dolaşısıyla BFG bakterilerinin kültürleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları rutin olarak çalışılmaz⁽²⁾. Bunun önemli nedenlerinden birisi, anaerob bakterilerin duyarlılıklarını belirlemek için önerilen agarda dilüsyon testinin, rutin mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanabi-

lecek pratik bir yöntem olmamasıdır⁽⁹⁾. Günümüzde güvenilir, hızlı, laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir yöntem geliştirme arayışları vardır. Çalışmalardan birisi European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'in geliştirmekte olduğu disk difüzyon yöntemiyle BFG bakterilerinde duyarlılık testidir⁽¹⁰⁾. Çalışmanın sonuçları BFG bakterilerde, belirli antibiyotikler için disk difüzyon testinin günlük laboratuvar uygulamalarında güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. Bir standart oluşturmak ve bir rehber hazırlamak adına optimizasyon çalışmaları sürdürülmektedir.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda, klinik materyallerden izole edilmiş BFG bakterilerinin EUCAST'ın geliştirmekte olduğu disk difüzyon yöntemi ve anaerob bakteriler için önerilen standart, agarda dilüsyon yöntemi ile duyarlılıklarının belirlenmesi, elde edilen sonuçlara göre disk difüzyon yönteminin laboratuvarımızda rutinde uygulanabilirliği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatların belirlenmesi: Çalışmamıza, Ocak 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen, enfeksiyon etkeni BFG bakterileri dâhil edilmiştir. Klinik örnekler genel cerrahi (n=17), iç hastalıkları (n=9), kadın hastalıkları (n=6), yoğun bakım servisleri (n= 5), acil servis (n=5), enfeksiyon hastalıkları (n=4) ve diğer kliniklerden gönderilmiştir. Örnekler 53 hastadan alınmış, çoğu batın içinden olmak üzere apselerden (n=26), dokudan biyopsi örneklerinden (n=10), kan (n=10) ve diğer vücut sıvılarından oluşmuştur. Birer plevra, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve dokudan biyopsi örneklerinden ikişer farklı BFG türü olmak üzere üretilen toplam 56 BFG izolatı çalışmaya alınmış, yineleyen üremelerden birisi çalışmaya dâhil edilmiştir. Tanımlanan izolatlar -80°C'de saklanmıştır. Duyarlılık testi yapılabildiği zaman, bakterilerin canlandırılması için zenginleştirilmiş Brucella agarda (%5 koyun kanı, K vitamin; 1 µg/ml ve hemin; 5 µg/ml bulunduran) üç kez ardışık olarak anaerob ortamda (Bactron-I, SHELLAB, ABD) kültürleri yapılmıştır.

İzolatların tanımlanması: Aerotolerans testiyle sadece anaerop ortamda üreyebilen, Gram negatif boyanma özelliğine sahip, identifikasyon amaçlı kullanılan kolistin (10 µg), vankomisin (5 µg) ve kanamisin (1000 µg) disklerine dirençli, safralı besiyerinde üreyebilen, hareketsiz, katalaz aktivitesi gösteren basiller BFG bakteri olarak değerlendirilmiştir⁽¹¹⁾. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. Sistemin kullanım kılavuzu önerilerine uygun olarak birer koloniden hazırlanan preparatlar lazer atışlarına maruz bırakılmış ve elde edilen kütle spektromları VITEK® MS'in (bioMérieux, Fransa) V3.0 bilgi veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakteri tanımlanmıştır. Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlanma kontrolü ATCC *Escherichia coli* 8739 izolatu ile yapılmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri: Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler; Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI) ve EUCAST önerileri dikkate alınarak seçilmiştir^(12,13). İzolatların ampicilin, ampicilin/sulbaktam, sefoksitin, imipenem, tigesiklin, klindamisin, moksifloksasin ve metronidazole (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ABD) duyarlılık durumları agarda dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle belirlenmiştir^(10,12). Kontrol olarak ATCC 25285 *Bacteroides fragilis* izolatu kullanılmıştır.

Agarda dilüsyon yöntemi: Agarda dilüsyon yönteminde CLSI (M11-A7) önerilerine uygun şekilde, antibiyotiklerin yarı yarıya sulandırılmalarıyla hazırlanmış, hemin, K vitamini ve %5 koyun kanı bulunduran Brucella agar kullanılmıştır⁽¹²⁾. K vitamini ve heminle zenginleştirilmiş Brucella sıvı besiyerlerinde bir gecelik inkübasyonla elde edilmiş bakteri kültürü 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde ayarlanmış, 1/10 oranında sulandırılmıştır. Bakteri süspansiyonundan 10'ar µl önceden hazırlanmış antibiyotikli besiyerlerine damlatılarak inoküle edilmiştir. Her bir plakta 25 izolat bulunacak şekilde inokülasyon işlemleri tamamlandıktan sonra plaklar 37°C'de 48 saat anaerop ortamda (Bactron-I, SHELLAB, ABD) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir⁽¹²⁾. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık durumu EUCAST klinik sınır değerlerine göre

yorumlanmıştır⁽¹³⁾. EUCAST klinik sınır değeri bulunmayan antibiyotikler için CLSI sınır değerleri kullanılmıştır. EUCAST ve CLSI'nın sınır değer bildirmediği tigesiklin için 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⁽¹⁴⁾.

Disk difüzyon metodu: Disk difüzyon metodu için; ampicilin (10 µg), ampicilin/sulbaktam (10/10 µg), sefoksitin (30 µg), imipenem (10 µg), tigesiklin (15 µg), klindamisin (10 µg), moksifloksasin (5 µg) ve metronidazol (5 µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, Birleşik Krallık) kullanılmıştır⁽¹⁰⁾. Besiyeri olarak EUCAST tarafından kullanılması üzerinde uzlaşmaya varılan Fastidious Anaerobe Agar (FAA) (LabM, Birleşik Krallık) çalışmaya alınmıştır⁽¹⁵⁾. Yüzde 5 oranında at kanı ile zenginleştirilmiş FAA, kalınlığı 4 mm olacak şekilde plaklara aktararak kurumaya bırakılmıştır. Diğer yandan bir gecelik inkübasyon sonrası FAA'dan elde edilen taze kültürden %0.9'luk tuzlu su içinde McFarland 1 bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmış, steril pamuklu eküvyon ile taze FAA'a, plağın tüm yüzeyine eşit yayılacak şekilde ekim yapılmıştır. Her bir 90 mm ebatlarındaki FAA plağına penset kullanılarak en fazla üç adet antibiyotik diski yerleştirilmiştir. İnokulum hazırlanması, ekim işleminin yapılması ve antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi EUCAST'in önerdiği 15'er (15-15-15) dakika kuralına göre bekletilmeden uygulanmıştır⁽¹⁰⁾. İşlemleri tamamlanan plaklar karanlık (besiyeri üreten firmanın önerisine istinaden) ve anaerop ortamda 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin çevresindeki üreme olmayan zon çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüş, daha önce yapılan çalışmalardan bildirilmiş sonuçlarla karşılaştırılmış, izolatlarımızın ilgili antibiyotiğe duyarlı (S) ve dirençli (R) olabileceği şeklinde çıkarımlar yapılmıştır. Agarda dilüsyon test sonuçları ile disk difüzyon test sonuçları karşılaştırılarak aralarında bağlantı bulmaya çalışılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada, 53 hastanın çeşitli klinik örneklerinden üretilmiş 56 BFG izolatu ele alınmıştır. İzolatların

Tablo 1. İzolatların elde edildikleri klinik örnekler göre dağılımı.

BFG bakteriler	Apse	BAI*	Doku	BOS**	Periton sıvısı	Plevra sıvısı	Toplam Sayı (n)
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	15	8	2	2	0	34
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0	4	0	1	1	2	11
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1	2	1	0	0	0	4
<i>Bacteroides ovatus</i>	0	0	1	0	0	1	2
<i>Bacteroides uniformis</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0	3	0	0	0	0	4
Toplam Sayı (n)	2	24	11	3	3	3	56

*BIA: Batın içi apse, **BOS: Beyin omurilik sıvısı

Tablo 2. BFG izolatlarının antimikrobiyallere duyarlılık durumları.

Antimikrobiyaller	Sınır değerleri ^a			MİK değerleri (µg/ml)			Duyarlılık profili (%)		
	Hassas	Orta	Dirençli	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Hassas	Orta	Dirençli
Ampisilin	≤0,5		>2	4->256	64	>258	0		100
Ampisilin/sulbaktam	≤4	32	>8	<0.125->64	2	16	66.1		33.9
Sefoksitin ^b	≤16		≥64	4->64	32	>64	68	16	16
İmipenem	≤2		>8	<0.06-64	0.05	2	98.2		1.8
Klindamisin	≤4	8	>4	0.25->256	16	>256	46.4		53.6
Tigesiklin ^c	≤4	4	≥16	0.25-16	1	8	89.3	8.9	1.8
Moksifloksasin ^b	≤2		≥8	0.05->64	4	32	57.1	12.5	30.4
Metronidazol	≤4		>4	0.5-8	0.05	2	98.2		1.8

^aEUCAST klinik sınır değerlerine göre, ^bCLSI klinik sınır değerlerine, ^cFDA klinik sınır değerlerine göre yorumlanmıştır.

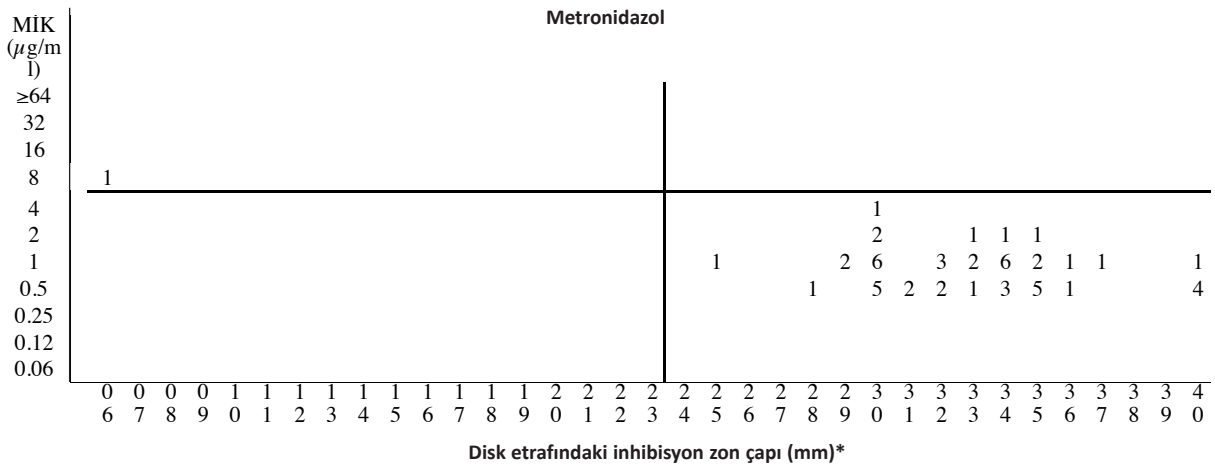
çoğunluğunu *B. fragilis* (n=34, %61), oluşturmuş bunu sırasıyla *B. thetaiotaomicron* (n=11, %20), *B. vulgatus* (n=4), *P. distasonis* (n=4), *B. ovatus* (n=2) ve *B. uniformis* (n=1) izlemiştir. İzolatlarımızın klinik örnekler göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Agarda dilüsyon test sonuçlarımıza göre izolatlarımızın tamamı ampisiline, %33.9'u ampisilin/sulbaktama, %16'sı ise sefoksitine dirençli bulunmuştur. Orta dirençli olanlar da değerlendirmeye katıldığında sefoksitine duyarlı olmayanların oranı %32'ye yükselmiştir. İkinci en yüksek direnç oranı klindamisine karşı (%53.6) saptanmış, bunu %30.4 (orta dirençliler ile birlikte toplam %42.9 oranında duyarlı olmayanlar) oranıyla moksifloksasine direnç izlemiştir. İzolatlar üzerine en etkili görülen antibiyotikler %1.8 direnç oranlarıyla imipenem, metronidazol ve tigesiklin olmuştur.

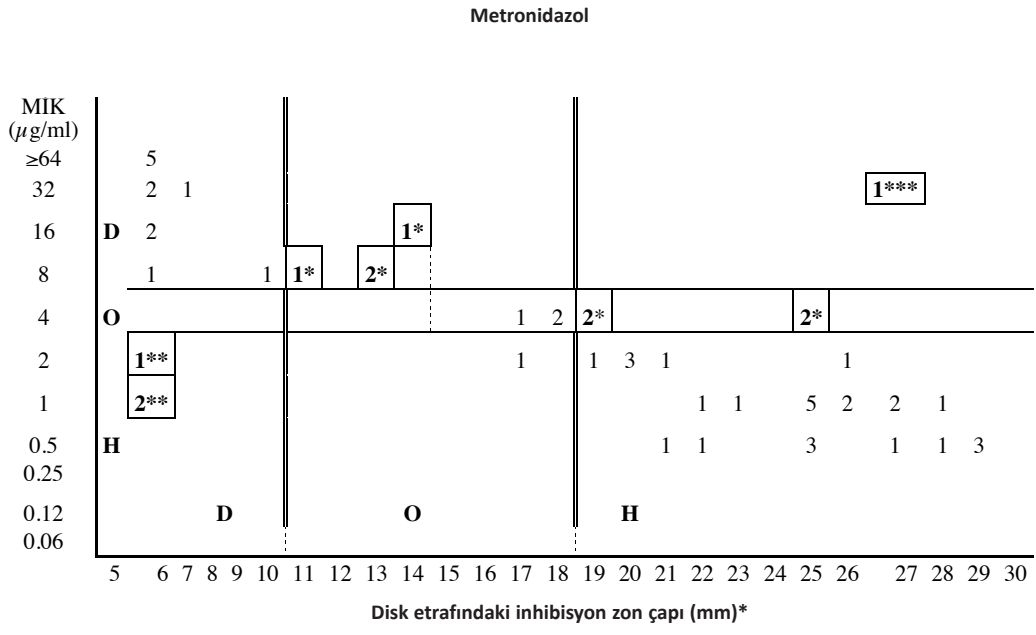
İzolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ve CLSI, EUCAST

ve FDA'nın klinik sınır değerlerine göre belirlenmiş antibiyotiklere duyarlılık durumları Tablo 2'de verilmiştir.

Disk difüzyon test sonuçları 24 saatlik inkübasyon sonunda disk etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Bakterilerin iyi üredikleri, zon çaplarının düzgün ve net bir şekilde görülebilir olduğu saptanmıştır. Daha önce duyarlılık zon sınır değerleri belirlenen antibiyotiklere (duyarlılık kriterleri; imipenem ≥29 mm, metronidazol ≥24 mm, klindamisin ≥25, moksifloksasin ≥19 mm) göre agarda dilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarımızın uyumluluğu araştırılmıştır. Metronidazol için agarda dilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarımızda %100 oranında uyumluluk saptanmış ve her iki test ile izolatlar hassas ya da dirençli olarak bulunmuştur. İki test sonuçları arasındaki uyumluluk diğer antibiyotiklerden imipenem için %89, klindamisin için %78.5 ve moksifloksasin için %76.7 olarak saptanmıştır. Uyum oranı daha



Şekil 1. BFG izolatlarının metronidazole karşı MİK değerleri ve aynı izolatların metronidazol diski (5 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması.
*inhibisyon zon çapını gösteren 06-40 rakamları alt alta yazılmıştır.



Şekil 2. BFG izolatlarının moksifloksasine karşı MİK değerleri ve aynı izolatların moksifloksasin diski (5 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması.
*Küçük hata, **Büyük hata, ***Çok büyük hata veren izolatlar. D; dirençli, O; orta dirençli, H; hassas

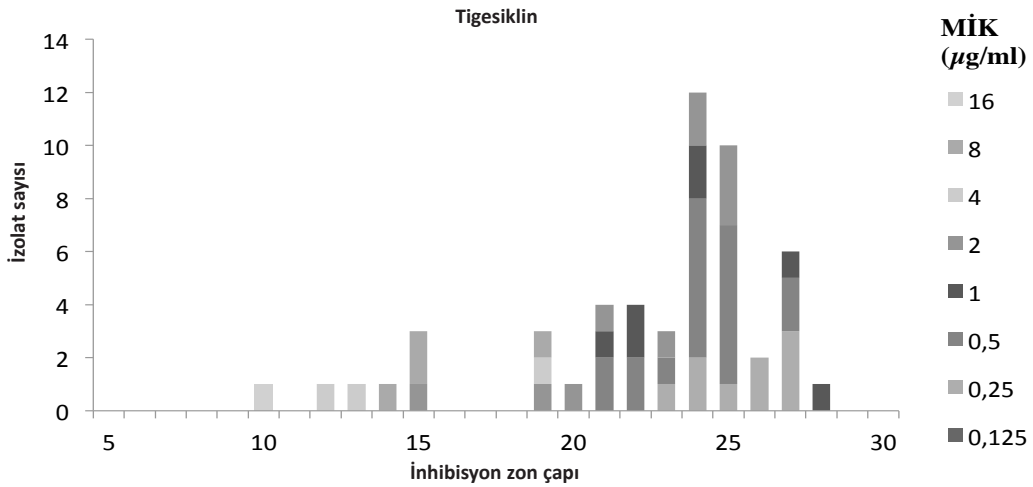
düşük olan klindamisin ve moksifloksasin için tür bazında zonu çapında belirgin farklılıkların olduğu gözlenmiştir (Tablo 3'te BFG izolatlarının tür bazında moksifloksasine göstermiş oldukları inhibisyon zonu çapları yer almaktadır). Ampisilin/sulbaktam ve sefoksitine duyarlılık sonuçlarında pek kıyaslanabilir değerler bulunamamış, aynı MİK değerlerine sahip izolatlar farklı inhibisyon zonu çapları veya aynı zonu çaplarına sahip izolatlar farklı MİK değerleri sergile-

yebilmişlerdir. Tigesiklin için disk difüzyon inhibisyon zonu çaplarıyla ilgili henüz sınır değerler belirlenmediğinden iki yöntemin sonuçları karşılaştırılamamıştır. Ancak, MİK değerlerine göre duyarlı izolatların (n=50) %92'sinde disk difüzyon testiyle inhibisyon zonu çapı 19 mm ve üzerinde bulunmuş, %8'inde ise 12 ile 15 mm arasında veriler elde edilmiştir. MİK sonucuna göre dirençli tek izolat ise 10 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuştur (Şekil 3a, 3b).

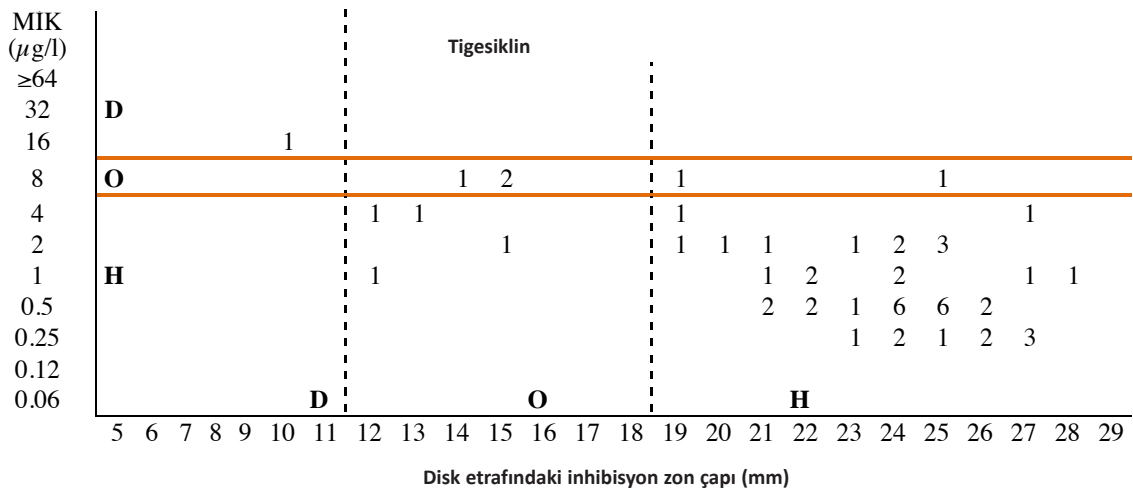
Tablo 3. Şekil 2'deki verilen BFG izolatlarının moksifloksasine karşı disk difüzyon inhibisyon zon çap ölçümlerinin MİK değerlerine göre dağılımı.

MİK (µg/l)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)
0.5	7	21, 25, 25, 28, 29, 29, 29	1	27	2	22, 25	0	-
1	12	6**, 6**, 22, 23, 25, 25, 25, 26, 26, 27, 27, 28	0	-	0	-	2	25, 25
2	2	6**, 27	4	19, 20, 20, 21	0	-	2	20, 17
4	4	17, 18, 19*, 19*	2	15, 25	1	18	0	-
8	5	6, 10, 11*, 13*, 13*	0	-	0	-	0	-
16	2	6, 14*	0	-	1	6	0	-
32	2	6, 27***	2	6, 7	0	-	0	-
≥64	0	-	2	6, 6	0	-	3	6, 6, 6

*Küçük hata, **Büyük hata, ***Çok büyük hata veren izolatlar



Şekil 3a. BFG izolatlarının tigesikline karşı MİK değerleri ve aynı izolatların tigesiklin diski (15 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması.



Şekil 3b. BFG izolatlarının tigesikline karşı MİK değerleri ve aynı izolatların tigesiklin diski (15 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması. Tigesiklin için disk diffüzyon inhibisyon zon çaplarıyla ilgili henüz belirlenmiş sınır değerler bulunmamaktadır. Verilerimize göre tigesiklin için önerilmesi muhtemel sınır değerleri; "≥19'lar hassas, <12'ler dirençli" olabilir.

D; dirençli, O; orta dirençli, H; hassas

TARTIŞMA

İzolasyonunun ve tanımlanmasının zor, zahmetli ve pahalı olması nedeniyle gerek dünyada gerekse ülkemizde çok az laboratuvar da anaerop bakteri kültürü yapılmaktadır. Anaeroplara bağlı enfeksiyon varlığında antianaerop etkiye sahip olduğu düşünölen antibiyotikler ile ampirik tedavi uygulanmaktadır⁽²⁾. Ancak, son yıllarda giderek artan antibiyotik direnci nedeniyle anaerop bakterilerin, özellikle BFG izolatlarının duyarlılıkları öngörülemez hâle gelmiştir. Ülkelere, şehirlere, merkezlere hatta aynı merkezde farklı kliniklere göre değişiklik göstermekle beraber çalışmalar, karbapenem, piperasilin/ tazobaktam, amoksisilin/klavulanik asit ve metronidazol gibi en aktif antibiyotiklere bile direnç geliştirdiğini göstermiştir^(3,4). Çok ilaca dirençli BFG izolatlarına bağlı olgu bildirimlerinde belirgin bir artış dikkat çekmektedir^(7,8). Bu gelişmeler günlük rutin laboratuvar uygulamalarında, anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarını belirleyen testlere duyulan gereksinimin büyüklüğünü gözler önüne sermektedir⁽⁹⁾.

Anaerop bakteriler için önerilen duyarlılık testi; agarda dilüsyon metodu, klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin stoklanıp biriktirilerek antibiyotik duyarlılıklarının toplu çalışılması için uygun bir yöntemdir. Rutin laboratuvar uygulamaları için pratik bir yöntem değildir⁽¹²⁾. Alternatif bir yöntem olarak anaeroplara uyarlanan, özel durumlarda, seçilmiş birkaç antibiyotik için kullanılabilen gradyan strip testi (E-testi) ise pahalıdır, düşük gelirli ölkelerdeki laboratuvarlarda düzenli olarak kullanılması mümkün değildir⁽¹⁶⁾. Günümüzde rutin laboratuvar uygulamalarında, anaerop bakteriler için kullanılacak ucuz, basit ve güvenilir sonuçlar veren duyarlılık yöntem arayışları sürmektedir. Aerop bakteriler için kullanılan disk difüzyon yönteminin *Clostridiodes difficile* ve BFG bakteriler gibi çabuk üreyen organizmaların duyarlılıklarını belirlemede çözüm olabileceği düşünölmüş ve bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Erikstrup ve ark.⁽¹⁷⁾, hastanede yatan ishali hastalardan izole edilmiş, gradyan strip testi ile metronidazol veya vankomisine duyarlılığı azalmış, moksifloksasin veya rifaksimine dirençli olduğu saptanan *C. difficile* izo-

latlarının disk difüzyon yöntemiyle aynı antibiyotiklere duyarlılıklarını araştırmışlar, iki yöntem sonuçları arasında kusursuz bir uyum saptamışlardır. Aynı çalışma grubu, rutin laboratuvar uygulamalarında disk difüzyon yönteminin *C. difficile* izolatlarının duyarlılığını belirlemede kullanılabileceğini deneyimlemiştir⁽¹⁸⁾.

Bacteroides izolatlarının duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin uygunluğunu saptamak için kapsamlı bazı çalışmalar yapılmıştır. Çeşitli besiyerleri, inkübasyon koşulları denenmiş, EUCAST'ın anaeroplara için belirlediği sınır değerler kullanılarak yapılan ilk karşılaştırmalı çalışma, 2013 yılında ECCMID Kongresinde sunulmuştur⁽¹⁹⁾. Toplam 104 BFG izolatının ele alındığı, besiyeri olarak koyun kanı, hemin ve K vitaminiyle zenginleştirilmiş Brucella agar, antibiyotiklerden piperasilin /tazobaktam, meropenem, klindamisin ve metronidazol antibiyotik disklerinin kullanıldığı bu çalışmada agarda dilüsyon MİK değerleriyle uyumlu sonuçlar alınmıştır. Nagy ve ark.⁽¹⁰⁾ tarafından yapılan, daha geniş bir bakteri topluluğu (n=381) ve dokuz antibiyotiğin ele alındığı, koyun kanlı Brucella agarın kullanıldığı çalışmada, disk difüzyon duyarlılık testinin günlük rutin laboratuvar çalışmalarında uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Uyumlu sonuçlar alınmakla beraber, deney koşullarıyla ilgili optimizasyon sürmektedir^(20,21). Bakterilerin üremesini daha fazla arttırdığı, piyasada daha kolay bulunabilir olduğu savıyla koyun kanıyla zenginleştirilmiş Brucella agar yerine at kanı eklenmiş FAA kullanılması kararlaştırılmış ve son çalışmalar at kanıyla zenginleştirilmiş FAA besiyeriyle alınan sonuçlara yoğunlaştırılmıştır⁽²²⁾.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş BFG bakterilerinin duyarlılıkları at kanıyla zenginleştirilmiş FAA kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiş, anaeroplara için standart yöntem olan agarda dilüsyon testiyle elde edilen MİK değerleriyle karşılaştırılmıştır. Antibiyotik diskleri, CLSI ve EUCAST klavuzlarında önerilen gram negatif anaerop bakterilerin duyarlılıklarını belirlemek için kullanılan antibiyotiklere göre seçilmiştir. Çalışmanın bütün basamaklarında inokölüm miktarından, besiyeri kalınlığına, inkübasyon sıcaklığı ve süresinden ve karanlık

ortamda tutulmasına kadar önerilen konulara titizlikle uyulmuştur. Testlerin değerlendirme aşamasında, inkübasyon sonrasında iyi üreme ve antibiyotik diskleri etrafında net inhibisyon zonları saptanmıştır.

İki duyarlılık testi arasındaki en yüksek benzer sonuçlar, %100 uyumla metronidazol ile yaklaşık %90 uyumla imipenem ile alınmıştır. Bu iki antibiyotikle uyumlu sonuçların alınması önemlidir. Bakteriyemi gibi invaziv enfeksiyonlarda tercih edilecek bakterisidal antibiyotikler karbapenemler ve metronidazoldür^(22,23). Günümüzde kullanılan kan kültür cihazlarıyla kanda üreme kısa sürede belirlenebilmektedir. Anaerob kültür pratiği olan laboratuvarlarda, üremeli kan kültür şişesinden yapılan ekimden 24 saatlik inkübasyon sonrası BFG bakteri kültürü elde edilebilmektedir⁽²⁴⁾. Kültürden yapılan disk difüzyon testiyle bakterilerin bu antibiyotiklere duyarlılıkları belirlenebilecektir. Hastanemizde karbapenemlere dirençli *Bacteroides* oranı diğer ülkelerdeki direnç oranlarına göre daha yüksektir⁽²⁵⁾. Bunun yanı sıra hastanemizde metronidazole dirençli *Bacteroides*'lere bağlı bakteriyemi olguları da saptanmıştır⁽²⁶⁾. Özellikle bakteriyemi etkeni BFG bakterilerinin kısa sürede tanımlanması, metronidazole ve imipeneme duyarlılıklarının belirlenmesi tedavinin başarılı olmasında önemlidir^(22,23).

İzolatlarımız üzerine imipenem ve metronidazolden sonra en etkili antimikrobiyallerden tigesiklin için disk difüzyon inhibisyon zon çapıyla ilgili henüz belirlenmiş sınır bir değer bulunmadığı için iki test arasındaki uyum hesaplanamamıştır. Verilerimize göre tigesiklin için önerilmesi muhtemel sınır değerlerinin "≥19 mm hassas, 18-12 mm orta dirençli ve <12'ler dirençli" olabileceğini düşünüyoruz (Şekil 3a, 3b). Bu değerler baz alındığında MİK değerleri ile disk difüzyon test sonuçları arasında %89.3 oranında uyum, %10.3 oranında minor hata (agar dilüsyon yönteminde duyarlı olup, disk difüzyon testiyle orta dirençli olanlar n=2, agar dilüsyon yönteminde orta dirençli olup, disk difüzyon testiyle duyarlı olanlar n=4) varlığından söz edebiliriz. Bu değerlendirmeye göre büyük hata veya çok büyük hatanın olmaması, tigesiklin için disk difüzyon testinin kullanılabilmesini düşündürmektedir.

Diğer antibiyotiklerden klindamisin ve moksifloksasin ile yapılan testlerde %75'ten daha yüksek oranda uyum gözlenmiştir. Ancak, bu oran kabul edilir (≥90) orandan düşüktür ve rutin laboratuvar pratiğinde kullanılması olası değildir. Tür düzeyinde değerlendirildiğinde, iki test arasındaki uyum oranı da değişiklik göstermektedir. Örneğin, moksifloksasin için küçük hata, büyük hata ve çok büyük hata veren izolatların daha çok *B. fragilis* türleri arasında yer aldığı görülmektedir. Çok sayıda bakterinin ele alındığı, özellikle tür düzeyinde yapılacak çalışmalar ile disk difüzyon testinin bu antibiyotikler için optimize edilmesi gereklidir. Gerek dünyada gerekse ülkemizde bu antimikrobiyallere yüksek oranda direnç bulunmaktadır, duyarlılık sonuçları saptanmadan ampirik tedavide kullanılmaları önerilmemektedir^(4-6,27-30). Bu nedenle BFG izolatlarının klindamisin ve moksifloksasine duyarlılıklarının belirlenmesi uygun antimikrobiyalin seçilmesinde önemlidir.

Ampisilin/sulbaktam ve sefoksitin diskleriyle yapılan çalışmalar pek tutarlı sonuçlar vermemiştir. Aynı MİK değerine sahip bazı organizmalar farklı disk inhibisyon zonu oluştururken, aynı disk zonu çapına sahip organizmalar farklı MİK değerleri göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalarda da beta-laktam grubu antibiyotiklerin benzer sonuçlar sergiledikleri belirtilmiştir^(10,15,21).

Test edilen izolat sayısının az olması çalışmamızın zayıf tarafını oluşturmaktadır. Daha fazla bakteriyi dâhil ederek optimize edilen çalışmalar ile bu eksikliklerin giderileceğine inanıyoruz. Bu zayıf tarafına karşın ileride yapacağımız çalışmalara kaynak oluşturması bakımından verilerimizin değerli olduğunu düşünüyoruz.

Sonuç olarak, BFG bakterilerinin, bu bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılan antimikrobiyallerden metronidazol, imipenem ve tigesikline duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin kolaylıkla uygulanabilir, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu söylenebilir. Ancak, bir standardın oluşturulması adına, özellikle diğer antimikrobiyaller için daha fazla izolatın ele alındığı, deney koşullarının optimize edildiği çalışmaların yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Teşekkür

Disk difüzyon testinde kullanmamız için bize FAA besiyerini hediye eden İŖveçli bilim insanı Prof. Dr. Erika Matuschek'e (EUCAST Geliştirme Laboratuvarı, Växjö Merkez Hastanesi Växjö, İsveç) teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun, 17.12.2018 tarih ve 254 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Finansal Destek: Bu çalışma, Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-100719-0261 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Marmara University Ethics Committee (12.17.2018-254).

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

Funding: Marmara University Scientific Research Projects Unit (Project No. SAG-C-YLP-100719-0261).

KAYNAKLAR

1. 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>
2. 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>
3. 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>
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. 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>
6. Nagy E, Urbán E, Nord CE, et al. 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>
7. Sóki J, Hedberg M, Patrick S, et al. Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. J Antimicrob Chemother. 2016;71(9):2441-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw175>
8. Merchan C, Parajuli S, Siegfried J, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Rahimian J. Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* bacteremia in a US resident: An emerging challenge. Case Rep Infect Dis. 2016; 2016:3607125. <https://doi.org/10.1155/2016/3607125>
9. 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>
10. Nagy E, Justesen US, Eitel Z, et al. Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. Anaerobe. 2015;31:65-71. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.10.008>
11. Nagy E, Boyanova L, Justesen US, et al. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories, Clin Microbiol Infect. 2018;24(11):1139-48. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.008>
12. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standards-7th Edition, M11-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, ABD, 2007.
13. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical breakpoints 2017. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
14. Tygacil®, 2010 Federal Drug Administration, Product Information, Pfizer Inc., Collegeville, PA, ABD.
15. Bavelaar B, Matuschek E, Morris T, et al. Performance of a new EUCAST disk diffusion method using fastidious anaerobe agar (FAA) for clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21-24 Nisan 2018, Madrid, İspanya: P0161.
16. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ, Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria, J Clin Microbiol. 1991;29(10):2197-203. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.10.2197-2203.1991>
17. Erikstrup LT, Danielsen TK, Hall V, et al, Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. Clin Microbiol Infect. 2012;18(8): E266-72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03907.x>

18. Holt HM, Danielsen TK, Justesen US. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype O27. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(11): 2243-6.
<https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>
19. Luu H, Thomsen MD, Hansen F, Citron DM, Kahlmeter G, Justesen US. Disc diffusion antimicrobial-susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group using EUCAST clinical minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 27-30 April 2013, Berlin, Almanya: P1577.
20. Dubreuil L, Members of the CA-SFM 2019. Improvement of a disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria, French recommendations revisited for 2020. *Anaerobe.* 2020;64:102213.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102213>
21. Ho PL, Yau CY, Ho LY, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group organisms in Hong Kong by the tentative EUCAST disc diffusion method. *Anaerobe.* 2017;47:51-6.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.04.005>
22. Bavelaar H, Justesen US, Morris T, Kahlmeter G, Matuschek E. Development of a EUCAST disk diffusion method for rapidly growing anaerobic bacteria using fastidious anaerobe agar (FAA). 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21-24 Nisan 2018, Madrid, İspanya: P0160.
23. Kim J, Lee Y, Park Y, et al. Anaerobic bacteremia: Impact of inappropriate therapy on mortality. *Infect Chemother.* 2016;48(2):91-8.
<https://doi.org/10.3947/ic.2016.48.2.91>
24. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, et al, Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis.* 2000;30(6):870-6.
<https://doi.org/10.1086/313805>
25. Toprak NU, Uzunkaya OD, Ski J, Soyletir G. Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (cfiA) and metronidazole (nim) among *Bacteroides* species in a Turkish University Hospital. *Anaerobe.* 2012;18(1):169-71.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.004>
26. Toprak lger N, Sayın E, Soyad A, Dane F, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen ilk metronidazole dirençli *Bacteroides* kökeni: *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(4):717-21.
<https://doi.org/10.5578/mb.5064>
27. 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>
28. DoĒan M, Baysal B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):211-9.
29. Demir C, Keli R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen gram-negatif anaerop 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>
30. Demirci M, Gemicioglu B, Saribas S, et al. A retrospective analysis of anaerobic bacteria isolated in 236 cases of pleural empyema and their prevalence of antimicrobial resistance in Turkey. *Clin Lab.* 2018;64(7):1269-77.
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180317>

HIV Pozitif Kişilerde Cinsel Yolla Bulaşan Etkenlerin Sıklığı

Frequency of Sexually Transmitted Pathogens in HIV- Positive Individuals

Tuğba Bozdemir*[©], Candan Çiçek*[©], Deniz Gökengin**[©], Sabire Şöhret Aydemir*[©], İmre Altuğlu*[©]
Uğur Önal**[©], Timur Köse***[©], Hüsnü Pullukçu**[©]

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

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

***Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Bozdemir T, Çiçek C Gökengin D, Aydemir SŞ, Altuğlu İ, Önal U, Köse T, Pullukçu H. HIV pozitif kişilerde cinsel yolla bulaşan etkenlerin sıklığı, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):119-25.

Öz

Amaç: Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar, toplum sağlığı açısından önemli, sık görülen enfeksiyonlardır. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların önlenmesi, erken tanı konulması ve tedavi edilmesi, "Human immunodeficiency virus" (HIV) bulaşının kontrol altına alınmasında önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, herhangi bir semptomu olmayan HIV pozitif kişilerdeki cinsel yolla bulaşan diğer enfeksiyon etkenlerini taramak ve etkenlerin HIV pozitif kişilerdeki sıklığını araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Eylül 2015 ile Nisan 2016 tarihleri arasında, 14'ü kadın (%15.6), 76'sı erkek (%84.4) olmak üzere cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar açısından asemptomatik olan 90 HIV pozitif kişiden vajinal ve üretral sürüntü örnekleri toplandı. Kişiler örneklerini kendileri aldı. Araştırmaya katılan olgular 20-69 yaş aralığındaydı (Medyan=36, SD=10.48). Örneklerden *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, Herpes simpleks virüs tip 1 ve 2, Human papillomavirüs gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR) yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: HIV pozitif kişilerin 49'unda (%54.4) en az bir cinsel yolla bulaşan etken pozitif bulundu. Örneklerin 31'inde (%34.4) Human papillomavirüs, 20'sinde (%22.2) *Ureaplasma urealyticum*, 15'inde (%16.6) *Ureaplasma parvum*, 8'inde (%8.8) *Mycoplasma genitalium*, 8'inde (%8.8) *Mycoplasma hominis*, 5'inde (%5.5) *Neisseria gonorrhoeae*, 2'sinde (%2.2) *Chlamydia trachomatis*, saptandı. *Trichomonas vaginalis*, Herpes virüs tip 1 ve 2 klinik örneklerin hiçbirinde saptanmadı.

Sonuç: HIV pozitif kişilerin yaklaşık %55'inde bir veya birden fazla cinsel yolla bulaşan patojenler pozitif bulunmuş ve en sık etken olarak Human papillomavirus saptanmıştır. Bu durum, asemptomatik bireylerde bile etkene yönelik tarama yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu konuda ülkemizdeki farkındalığın artırılmasına yönelik çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Cinsel yolla bulaşan hastalıklar, HIV, HPV, Real-time PCR

ABSTRACT

Objective: Sexually transmitted infections are frequently seen and significant infections for public health. Prevention, early diagnosis and treatment of sexually transmitted infections have an important role in controlling the transmission of Human Immunodeficiency Virus (HIV). The investigation of the frequency of other sexually transmitted pathogens in asymptomatic HIV- positive individuals was aimed in the present study.

Method: Vaginal and urethral swab samples were collected by 90 HIV- positive asymptomatic individuals themselves aged between 20-69 (median=36, SD=10.48) years, between September 2015 and April 2016. The samples were assessed for the presence of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, Herpes simplex virus type 1 and 2, and Human papillomavirus using real-time polymerase chain reaction (PCR) method.

Results: At least one or more than one sexually transmitted pathogen was identified in 49 (54.4%) of 90 HIV-positive individuals. Human Papillomavirus was found in 31 (34.4%), *Ureaplasma urealyticum* in 20 (22.2%), *Ureaplasma parvum* in 15 (16.6%), *Mycoplasma genitalium* in 8 (8.8%), *Mycoplasma hominis* in 8 (8.8%), *Neisseria gonorrhoeae* in 5 (5.5%) and *Chlamydia trachomatis* in 2 (2.2%) individuals. *Trichomonas vaginalis*, Herpes simplex virus type 1 and 2 were not detected in any of the clinical specimens.

Conclusion: Approximately 55% of 90 HIV- positive individuals were found to be positive for sexually transmitted pathogens, and Human Papillomavirus was the most frequently detected pathogen. This condition reveals the necessity of screening even asymptomatic individuals for the presence of this pathogen. Studies are needed to increase awareness in our country on this issue.

Keywords: Sexually transmitted diseases, HIV, HPV, Real-time PCR

Alındığı tarih / Received:
17.11.2020 / 17.November.2020

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

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

T. Bozdemir 0000-0001-5512-6231
C. Çiçek 0000-0002-3486-8305
D. Gökengin 0000-0003-0704-2302
S. Ş. Aydemir 0000-0001-8354-9100
İ. Altuğlu 0000-0002-8280-6037
U. Önal 0000-0001-6194-3254
T. Köse 0000-0002-5238-9738
H. Pullukçu 0000-0001-6363-2708

✉ tugbagover@hotmail.com

GİRİŞ

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE), sosyal ve ekonomik problemlere yol açan küresel bir sağlık sorunudur. Dünya çapında her gün bir milyondan fazla yeni CYBE oluşmaktadır. Cinsel temas yoluyla 30'dan fazla farklı bakteri, virüs ve parazitin bulaştığı bilinmektedir. Her yıl 376 milyon kişi dört CYBE etkeninden (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* ve *Trichomonas vaginalis*) biri ile enfekte olmaktadır. Dünyada 290 milyondan fazla kadın human papillomavirus (HPV) ile enfektedir⁽¹⁾. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar aynı zamanda HIV bulaşma riskini arttırmaktadır⁽²⁾.

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ile HIV enfeksiyonunun cinsel yolla bulaşması arasında ilişki olduğuna dair birçok çalışma yayınlanmıştır. HIV ve çeşitli CYBE'ler arasında HIV alımının ve bulaşmasının artmasına neden olabilecek epidemiyolojik bir sinerji olduğuna dair kanıtlar vardır. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların önlenmesi, erken tanı konulması ve tedavi edilmesi, HIV bulaşının kontrol altına alınmasında önemli bir yere sahiptir⁽³⁾.

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar sıklıkla asemptomatik seyrederek ve klinik tanı koymak zordur. Koenfeksiyonların fazla olması ve etkenlerin çoğunda kültür yöntemleri ile tanı konulmasındaki sınırlamalar göz önüne alındığında, nükleik asit amplifikasyon testleri CYBE tanısında önemli testler hâline gelmiştir⁽⁴⁾.

Bu çalışmanın amacı, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda takip edilen HIV pozitif kişilerdeki CYBE etkenlerinden *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, herpes simpleks virüs (HSV) tip 1 ve 2, HPV'nin 19 yüksek ve olası yüksek riskli genotipini (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) ve dokuz düşük riskli genotipini (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) real-time PCR yöntemi ile taramak ve etkenlerin HIV pozitif kişilerdeki sıklığını saptamaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma kesitsel ve prospektif bir araştırma olarak planlandı. Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'ne Eylül 2015-Nisan 2016 tarihleri arasında takip ve tedavi amacıyla müracaat eden ve katılmayı kabul eden yaşları 20-69 yaş arasında değişen CYBE semptomu olmayan 90 HIV pozitif kişi araştırmaya dâhil edildi.

Kadın olgulardan vajinal sürüntü örneği, erkek olgulardan üretral ağız sürüntü örneği alındı. Kişiler örneklerini kendileri aldı. Araştırmaya dâhil olan kişilere dakron eküvyon ve viral transport besiyeri verildi ve nasıl örnek alacakları tanımlandı. Toplanan örnekler en kısa zamanda soğuk zincir kurallarına uyularak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Laboratuvarı'na ulaştırıldı ve hemen işleme alınmayacak örnekler -80°C'de saklandı.

Klinik örneklerin ekstraksiyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. (Ribospin vRD viral RNA / DNA Ekstraksiyon Kiti, Seegene, Güney Kore). *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *T. vaginalis* etkenleri için multipleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile çalışan Anyplex™ II STI-7 Detection (Seegene, Güney Kore) kiti kullanılarak her bir PCR tüpüne 15 µL mastermix karışımı dağıtılıp üzerine 5 µL nükleik asit örnekleri ayrı bir alanda eklendi. Firmanın önerdiği amplifikasyon profili kullanılarak CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad) cihazında amplifikasyon yapıldı. Her örnek için bir çukur kullanıldı ve her örnek için bir çukurda ikişer farklı Tm'ye sahip dört farklı floresan (FAM, HEX, CALRED 610, QUASAR 670) ile işaretli problemler kullanılarak erime eğrisi analizi ile etkenler saptandı. HPV tiplerini saptamak için Anyplex™ II HPV 28 Detection (Seegene, Güney Kore) kiti kullanılarak her örnek için iki ayrı PCR tüpüne (A seti ve B seti) 15 µL mastermix karışımı dağıtılıp üzerine 5 µL nükleik asit örnekleri eklenerek "CFX96™ Real-time PCR System" (Bio-Rad, ABD) cihazında amplifikasyon yapıldı. Her örnek için iki ayrı çukurda üçer farklı Tm'ye sahip beş farklı floresan (FAM, HEX, CALRED 610, QUASAR 670, QUASAR 705) ile işaretli

problar kullanarak erime eğrisi analizi ile etkenler saptandı. HSV tip 1 ve tip 2 için real-time PCR yöntemi ile çalışan HSV 1/2 Qual Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak her bir örnek için 10 µL mastermix üzerine 10 µL nükleik asit örnekleri eklenerek amplifikasyon ve saptama işlemleri Light-Cycler 2.0 (Roche, Almanya) cihazı kullanılarak yapıldı.

Sonuçlar SPSS 23.0 programında, ki-kare testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi ve anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

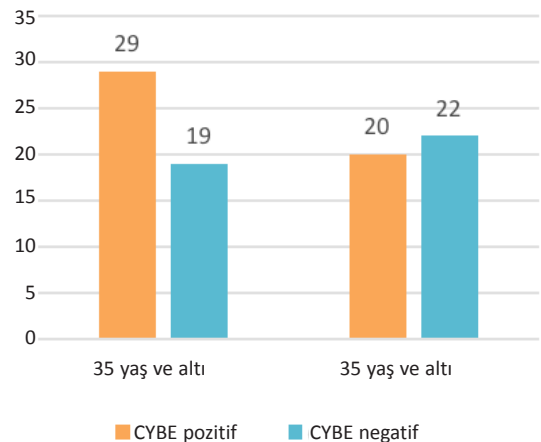
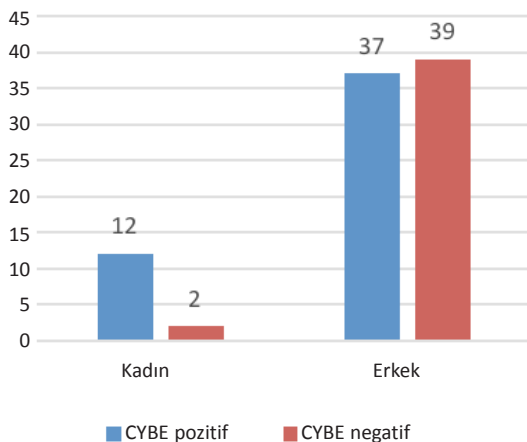
BULGULAR

Klinik örnekler, 14'ü kadın (%15.6), 76'sı erkek (%84.4) olmak üzere toplam 90 HIV pozitif kişiden toplandı. Araştırmaya katılan olgular 20-69 yaş aralığındaydı (Medyan=36, SD=10.48). HIV pozitif kişilerin 49'unda (%54.4) en az bir cinsel yolla bulaşan etken pozitif saptandı. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyon etkenlerinin oranı kadınlarda (%85.7) erkeklere (%48.7) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.024$). Yaşa göre değerlendirme yaptığımızda, olgular 35 yaş ve altı ile 35 yaş üstü şeklinde iki grupta toplandı. Her iki yaş grubu arasında CYBE etken pozitifliği oranı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0.224$). Yaş ve cinsiyete göre CYBE pozitifliği Şekil 1'de gösterildi.

HIV pozitif kişilerin üretral ve vaginal sürüntü örnek-

lerinde CYBE'ler tekli ya da çoklu etken olarak saptandı. Olguların 17'sinde (%18.8) HIV haricinde tek bir CYBE etkeni saptanırken, 32'sinde (%35.5) birden fazla etken olduğu belirlendi. Cinsel yolla bulaşan etkenler içinde HPV %34.4 (n=31), *U. urealyticum* %22.2 (n=20), *U. parvum* %16.7 (n=15), *M. genitalium* %8.9 (n=8), *M. hominis* %8.9 (n=8), *N. gonorrhoeae* %5.5 (n=5), *C. trachomatis* %2.2 (n=2) oranında saptandı. Kadın olguların 10'unda çoklu etken ikisinde tek etken, erkek olguların ise 22'sinde çoklu etken, 15'inde tek etken vardı. Kadın ve erkekler arasında tek etken veya çoklu etken saptanma oranları açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.121$). Örneklerin hiçbirinde HSV tip 1, HSV tip 2 ve *T.vaginalis* saptanmadı. HIV pozitif kişilerde CYBE pozitif örneklerde saptanan etkenlerin dağılımı Tablo 1'de gösterildi.

Örneklerin %34.4'ünde (31/90) en az bir HPV genotipi pozitif bulundu; 13'ünde (%41.9) olası yüksek riskli ve yüksek riskli tip, altısında (%19.3) düşük riskli tip ve 12'sinde (%38.7) hem yüksek hem de düşük riskli tip birlikte bulundu. Kadın olguların dokuzunda (%64.3), erkek olguların 22'sinde (%28.9) HPV pozitifliği. Cinsiyet dağılımlarına göre HPV pozitifliğinin kadınlarda, erkeklere oranla daha sık olduğu belirlendi. ($p=0.015$). HPV genotipleri arasında en sık, 16, 54, 42, 53 ve 68 tipleri saptandı. Toplamda 16 (%51.6) örnekte enfeksiyona neden olan tek bir HPV tipi, 15 (%48.4) örnekte ise çoklu HPV genotipleri saptandı. Olguların HPV genotip dağılımları Tablo 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Yaş ve cinsiyete göre CYBE pozitifliği.

Tablo 1. HIV pozitif kişilerde CYBE pozitif örneklerde saptanan etkenlerin dağılımı.

Tekli enfeksiyon etkenleri		Çoklu enfeksiyon etkenleri	
Etken	n (%)	Etkenler	n (%)
<i>Ureaplasma</i> spp.	9 (10)	Tek HPV genotipi + <i>Ureaplasma</i> spp. *	8 (8.9)
Tek HPV genotipi	5 (5.5)	Çoklu HPV genotipi	7 (7.8)
<i>Mycoplasma</i> spp.	2 (2.2)	<i>Ureaplasma</i> spp. + <i>Mycoplasma</i> spp. **	4 (4.5)
<i>C. trachomatis</i>	1 (1.1)	Tek HPV genotipi + <i>Ureaplasma</i> spp. + <i>Mycoplasma</i> spp.	3 (3.3)
		Çoklu HPV genotipi + <i>Ureaplasma</i> spp. + <i>Mycoplasma</i> spp.***	3 (3.3)
		Çoklu HPV genotipi + <i>Ureaplasma</i> spp. + <i>N. gonorrhoeae</i>	2 (2.2)
		<i>Ureaplasma</i> spp. + <i>Mycoplasma</i> spp. + <i>C. trachomatis</i>	1 (1.1)
		<i>Ureaplasma</i> spp. + <i>Mycoplasma</i> spp. + <i>N. gonorrhoeae</i>	1 (1.1)
		Çoklu HPV genotipi + <i>Ureaplasma</i> spp.	1 (1.1)
		Çoklu HPV genotipi + <i>N. gonorrhoeae</i>	1 (1.1)
		Çoklu HPV genotipi + <i>Ureaplasma</i> spp. + <i>N. gonorrhoeae</i>	1 (1.1)
Toplam	17 (18.8)	Toplam	32 (35.5)

HPV: Human Papilloma Virüs

*Sekiz hastanın birinde *Ureaplasma parvum* ve *U. urealyticum* etkenleri birlikte saptanmıştır.

**Dört hastanın birinde *Ureaplasma parvum* ve *U. urealyticum* etkenleri birlikte saptanmıştır.

***Üç hastanın birinde *M. genitalium* ve *M. hominis* etkenleri birlikte saptanmıştır.

Tablo 2. HPV DNA pozitif örneklerin genotip dağılımı.

Tek HPV tipi ile enfeksiyon		Çoklu HPV tipi ile enfeksiyon	
HPV tipi	n (%)	HPV tipi	n (%)
HPV 6	1 (3.2)	HPV 16 + diğer HPV tipleri	4 (12.9)
HPV 16	4 (12.9)	HPV 18 + diğer HPV tipleri	2 (6.5)
HPV 31	2 (6.5)	Diğer çoklu HPV tipleri	9 (29)
HPV 35	1 (3.2)		
HPV 42	1 (3.2)		
HPV 45	1 (3.2)		
HPV 54	3 (9.7)		
HPV 56	1 (3.2)		
HPV 59	1 (3.2)		
HPV 73	1 (3.2)		
Toplam	16 (51.6)		15 (48.4)

HPV: Human Papilloma Virüs

TARTIŞMA

Bu çalışma, HIV ile yaşayan ve klinikte yakın takip edilen bireylerde CYBE'lerin yaygın olarak bulunduğunu ve kadınlarda erkeklere göre anlamlı ölçüde daha fazla saptandığını ortaya koymuştur.

HIV bulaşı çoğunlukla cinsel yolla bulaş şeklinde gerçekleşir ve genel olarak cinsel yolla bulaşan diğer bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, HIV bulaşma riskini artırır ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunur⁽⁵⁾. Bu nedenle, Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention,

CDC), HIV ile yaşayan kişilerin CYBE açısından taranmasını önerir⁽⁶⁾. Bu enfeksiyonların epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması, erken tanımlanması ve tedavi edilmesi, HIV enfeksiyonundan etkilenen topluluklarda hem kişinin kendi sağlığı hem de bulaşın azaltılması açısından önemlidir.

Küresel boyutta HIV ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda son 10 yılda yeni enfeksiyonların sayısında %23 azalma olmasına karşın, Türkiye'de son 10 yıllık sürede dikkati çeken bir artış yaşanmaktadır. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün HIV istatistik verilerine göre, 1985 yılından 31 Aralık 2019 tarihine kadar toplam olgu sayısının 26.164 (%80.7'si erkek, %19.3'ü kadın) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma da kesitsel bir araştırma olarak planlanmış ve ülkemiz verilerine benzer oranlarda erkek (%84.4) ve kadın (%15.6) olgu çalışmaya katılmıştır. Türkiye'de yapılmış çeşitli çalışmalarda, geç tanı oranlarının, Avrupa ortalamasına benzer şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda olgu sayısında gözlenen bu hızlı artıştan, Avrupa genelinde olduğu gibi, olguların yarısından fazlasının geç tanı alması, kondom kullanım oranlarının düşük olması ve temas öncesi profilaksinin kullanıma sunulmaması sorumlu olabileceği gibi, eşzamanlı bulunan diğer CYBE'lerin de bulaşa katkıda bulunma olasılığı göz ardı edilmemelidir⁽⁷⁻¹¹⁾.

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyon etkenleri; üretrit, prostatit, epididimit, vajinit, genital ülser gibi kliniklerle ortaya çıkabilirken, asemptomatik olarak da görülebilirler. Kadınlarda, erkeklere oranla bu klinik tabloların asemptomatik görülme sıklığı daha fazladır⁽¹²⁾. Bu çalışmada, kadın ve erkek olgu sayısı arasında fark olmasına rağmen, kadınlarda (%85.7) CYBE etken pozitifliği erkeklere (%48.7) oranla anlamlı derecede fazla saptanmıştır. Bu durum, çalışmaya alınan olguların CYBE semptomu varlığına bakılmaksızın rutin tanı ve tedavi takibi için başvuran HIV pozitif kişilerden oluşması ve CYBE'lerin asemptomatik görülme oranının kadınlarda daha sık olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmada, CYBE'ler için risk faktörleri incelenmemiş olduğu için kadınlarda bu etkenlerin daha fazla görülme nedeninin daha riskli davranışlar mı yoksa yıllar önce edinilmiş enfeksiyonun süregitmesi mi olduğunu ayırt etmek olası olmamıştır. Ayrıca çalışmaya katılan kadın sayısının az olması da bu sonuca katkıda bulunmuş olabilir.

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların prevalansı çevresel faktörlere, seçilen nüfusun yaşam alışkanlıklarına, örnek türü gibi değişkenlere bağlı olarak farklılıklar gösterir^(13,14). Ülkemizde, nükleik asit amplifikasyon yöntemleri pek çok alanda yaygın kullanılmasına karşın, CYBE tanısı için olanaklar son derece sınırlıdır. Bunun nedenleri arasında, CYBE düşündüren yakınmalarla başvuran olguların farklı klinik disiplinler tarafından görülmesi ve klinisyenlerden tanı testleri için talep gelmemesi, tedavide kullanılan ilaçların bedelinin, tanı için kullanılan testlerin bedelinden çok daha az olması ve CYBE'lerin öneminin yeterince fark edilmemesi sayılabilir⁽¹⁵⁾. HIV pozitif bireylerde de CYBE taraması rutin izlemde yapılmamaktadır.

Bu çalışmada, cinsel yolla bulaşan etkenler arasında en sık HPV olmak üzere sırasıyla *Ureaplasma* spp. ve *Mycoplasma* spp. etkenleri saptanmıştır. *Neisseria gonorrhoeae* ve *C. trachomatis* daha az sayıda örnekte saptanırken, *T. vaginalis* ve HSV tip 1 ve 2 örneklerin hiçbirinde saptanmamıştır. Kullandığımız realtime PCR yöntemi ile 28 farklı HPV genotipi araştırılmış ve HPV genotipleri içinde en sık HPV16 genotipi saptanmıştır. Diğer sık saptanan genotiplerin ise 42, 54, 53 ve 68 olduğu görülmüştür. Türkiye'de HIV

pozitif kişilerde CYBE etkenlerinin sıklığını araştıran çok az sayıda çalışmada, seçilen örnek türü ve yöntem göre farklı oranlar elde edilmiştir. Zarakolu ve ark.'nın⁽¹⁶⁾ çalışmasında, en sık rastlanılan etkenlerin bu çalışma ile benzer şekilde *Ureaplasma* spp. ve *Mycoplasma* spp. olduğu belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada yalnızca *N. gonorrhoeae* ve *C. trachomatis* etkenleri araştırılmış ve bu çalışma ile benzer oranlarda etkenler saptanmıştır⁽¹⁷⁾. Bu iki çalışmada, HPV sıklığı araştırılmamıştır. Ülkemizde HIV pozitif kişilerde HPV sıklığı ve genotip dağılımı ile ilgili veriler de sınırlıdır. Hasbek ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ HIV durumu bilinmeyen 368 kadının servikal örneklerinde HPV DNA pozitifliğini araştırdıkları çalışmada, HPV pozitifliği (%28.8) bu çalışmaya göre (%34.4) daha düşük oranda saptanmasına rağmen, en sık bulunan genotip benzer şekilde HPV 16 olmuştur. Dünyanın farklı bölgelerinden HIV pozitif kişilerle yapılan farklı çalışmalarda en sık rastlanan CYBE etkeninin HPV olduğu belirlenmiştir^(19,20). Bu çalışmada da HPV en sık saptanan etken olmuştur. Boldrini ve ark.'nın⁽²¹⁾ çalışmasında, bu çalışma ile benzer şekilde en sık saptanan HPV genotipi 16 iken, Badial ve ark.'nın⁽²²⁾ çalışmasında farklı olarak en sık saptadıkları genotip HPV 56, ikinci en sık HPV 16 olmuştur. Çalışmalarda farklı popülasyonlarda, farklı etken gruplarına bakılmış olması nedeniyle, çalışmaların birebir karşılaştırılarak değerlendirilmesi olası olmamıştır.

Çalışmaya dâhil edilen olguların partner sayısı ve özellikleri, kondom kullanımı gibi risk faktörlerinin tanımlanmamış olması ve buna yönelik bir karşılaştırma yapılamaması bu çalışmanın başlıca kısıtlılıklarıdır. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların prevalans çalışmalarında, olgu sayısının yeterliliği, seçilen olgu grubu için ek risk faktörleri, cinsiyetler arasındaki farklılıklar önemli bir yer oluşturmaktadır ve bunların standardize edilmesi oldukça zordur.

Sonuç olarak, hastanemize başvuran HIV pozitif kişilerde bir veya birden fazla HIV dışı CYBE etken sıklığı yaklaşık %55 oranında saptanmış olup, bu kişilerde önemli bir sağlık sorunu oluşturur. Bu durum, HIV pozitif kişilerin cinsel yolla bulaşan enfeksiyon semptomları olmasa bile CYBE açısından düzenli olarak taraması gerekliliğini ortaya koyar. Bu konuda ülke-

mizdeki farkındalığın artırılmasına ve rutin tanı olanaklarının klinisyenlerin hizmetine sunulmasına gereksinim vardır. Tüm kısıtlılıklarına karşın bu çalışma, sayıları hızla artan HIV ile yaşayan bireylerde cinsel sağlık ve bulaştırıcılık açısından önem taşıyan ve verilerin son derece kısıtlı olduğu bu konudaki bilgi dağarcığına katkı sunmaktadır.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun, 22.09.2014 tarih ve 14-9/1 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Finansal Destek: Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2015-TIP-057 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Ege University Ethics Committee (09.22.2014-14/1).

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

Funding: Ege University Scientific Research Projects Unit (Project No. 2015-TIP-057).

KAYNAKLAR

1. WHO. Sexually transmitted infections (STIs). Fact Sheet. Geneva: World Health Organization. 2019. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections] (Erişim tarihi: 21.07.2020).
2. Donoval BA, Landay AL, Moses S, et al. HIV-1 target cells in foreskins of American men with varying histories of sexually transmitted infections. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(3):386-91. <https://doi.org/10.1309/JVHQVDJDYKM58EPH>
3. Rottingen J, Cameron DW, Garnett GP. A systematic review of the epidemiologic interactions between classic sexually transmitted diseases and HIV: how much really is known? *Sex Transm Dis.* 2001;28(10):579-97. <https://doi.org/10.1097/00007435.200110000-00005>
4. Barrientos-Durán A, de Salazar A, Alvarez-Estévez M, Fuentes-López A, Espadafor B, Garcia F. Detection of sexually transmitted disease-causing pathogens from direct clinical specimens with the multiplex PCR-based STD Direct Flow Chip Kit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(2):235-41. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03686-w>
5. Taylor MM, Wi TE. Transforming and integrating STI surveillance to enhance global advocacy and investment in STI control. *J Int AIDS Soc.* 2019;22(6):e25361. <https://doi.org/10.1002/jia2.25361>
6. CDC. STDs and HIV Fact Sheet. Centres for Disease Control and Prevention, 2010. [https://www.cdc.gov/std/hiv/stds-and-hiv-fact-sheet.pdf]. (Erişim tarihi: 01.07.2020).
7. Erdinc FS, Dokuzoguz B, Unal S, et al. Temporal trends in the epidemiology of HIV in Turkey. *Curr HIV Res.* 2020;18(4):258-66. <https://doi.org/10.2174/1570162X18666200427223823>
8. Karaosmanoğlu HK, Mete B, Gündüz A, et al. Late presentation among patients with human immunodeficiency virus infection in Turkey. *Cent Eur J Public Health.* 2019;27(3):229-34. <https://doi.org/10.21101/cejph.a5416>
9. ECDC. HIV/AIDS surveillance in Europe 2019-2018 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control/ WHO Regional Office for Europe. 2019. [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/hiv-surveillance-report-2019.pdf]. (Erişim tarihi: 25.10.2020).
10. Gökengin D, Oprea C, Begovac J, et al. HIV care in Central and Eastern Europe: How to close are we to the target? *Int J Infect Dis.* 2018;70:121-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.03.007>
11. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı İstatistiksel Verileri: HIV/AIDS [https://hsgm.saglik.gov.tr/bulasici-hastaliklar/hiv-aids/hiv-aids-liste/hiv-aids-istatistik.html]. (Erişim tarihi: 20.08.2020).
12. Lawson RM. Sexually transmitted infections and human immunodeficiency virus. *Nurs Clin North Am.* 2020;55(3):445-56. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2020.06.007>
13. Wand H, Morrills N, Dassaye R, Reddy T, Ramjee G. Correlates of sexually transmitted infections among South African women using individual and community level factors: Results from generalized additive mixed models. *Arch Sex Behav.* 2020;49(6):1875-86. <https://doi.org/10.1007/s10508-018-1315-3>
14. Serter D. Türkiye'de ve Dünyada cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve HIV/AIDS. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci.* 2006;2(11):1-5.
15. Atalay S, Gökengin D, Ertem E, Serter D, Serin DÇ. Birinci basamak sağlık kuruluşlarında basit mikrobiyolojik testlerle desteklenmiş sendrom yaklaşımı akış şemaları

- ile cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların saptanması: Kesitsel bir çalışma. *Smyrna Tıp Dergisi*. 2014;3:1-9.
16. Zarakolu P, Çetik S, İnkaya AÇ, Ünal S. HIV ile enfekte erkeklerde *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp. ve *Mycoplasma* spp. varlığının aranmasında immünokromatografik (İK) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun (Rt-PCR) testlerinin kıyaslanması. *Mikrobiyol Bul*. 2019;53(1):37-42.
<https://doi.org/10.5578/mb.67694>
17. Dolapçı İ, Tekeli A, Koyuncu E, Güven GS, Ünal S. Üretrit semptomları olmayan HIV pozitif erkeklerde *Neisseria gonorrhoeae* ve *Chlamydia trachomatis* varlığı. *Mikrobiyol Bul*. 2006;40(1-2):63-7.
18. Hasbek M, Çelik C, Çabuk A, Bakıcı MZ. Sivas bölgesinde servikal örneklerde Human papillomavirus sıklığı ve genotip dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*. 2018;48(3):199-204.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.199>
19. Remis RS, Liu J, Loutfy M, et al. The epidemiology of sexually transmitted co-infections in HIV-positive and HIV-negative African-Caribbean women in Toronto. *BMC Infect Dis*. 2013;13:550.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-550>
20. Vermund SH, Wilson CM, Rogers AS, Partlow C, Moscockı AB. Sexually transmitted infections among HIV infected and HIV uninfected high-risk youth in the reach study. *J Adolesc Health*. 2001;29(3):49-56.
[https://doi.org/10.1016/S1054-139X\(01\)00296-8](https://doi.org/10.1016/S1054-139X(01)00296-8)
21. Boldrini NAT, Volpini LPB, Freitas LB, et al. Anal HPV infection and correlates in HIV infected patients attending a sexually transmitted infection clinic in Brazil. *PLoS One*. 2018;13(7):e0199058.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199058>
22. Badial RM, Dias MC, Stuqui B, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) in HIV-infected women and its relationship with HPV/HIV co-infection. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(14):e9545.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009545>

Fetal Anomali ve Hidrops Fetalis Tanısı Almış Gebelerde Real Time PCR Yöntemi ile Human Parvovirüs B19 Pozitifliğinin Araştırılması

Investigation of Human Parvovirus B19 Positivity by Real-Time PCR Method in Pregnant Women with Fetal Anomaly and Hydrops Fetalis

Meryem Çolak*[Ⓞ], Aylin Altay Koçak**[Ⓞ], Deniz Karçaaltıncaba***[Ⓞ], Işıl Fidan****[Ⓞ], Güleendam Bozdayı***[Ⓞ]

*Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Karabük, Türkiye

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

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

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

Atf/Cite as: Çolak M, Altay Koçak A, Karçaaltıncaba D, Fidan I, Bozdayı G. Fetal anomali ve hidrops fetalis tanısı almış gebelerde real Time PCR yöntemi ile human parvovirüs B19 pozitifliğinin araştırılması, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):126-31.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, fetal anomali ve hidrops fetalis tanısı almış gebelerde Parvovirüs-B19 DNA pozitifliğini retrospektif olarak araştırarak; fetal enfeksiyon, virüs ve viral yük ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya Temmuz 2014-Mart 2018 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen on bir hastaya ait; on iki klinik örnek dâhil edildi. Parvovirüs B19 IgM/IgG antikorları ELISA yöntemi (NovaTec, Almanya) ile değerlendirildi ve Real-Time PCR yöntemi (LightMix® Kit Parvovirus B19, Roche, Almanya) ile Parvovirüs-B19 DNA varlığı kantitatif olarak araştırıldı.

Bulgular: Klinik örneklerde %16.7 (2/12) Parvovirüs-B19 DNA pozitifliği belirlendi. Fetal anomali saptanmış 22 haftalık gebeden eşzamanlı alınan amniyon sıvısı ve serum örneklerinden amniyon sıvısında 10⁶ kopya/ml, serum örneğinde 10³ kopya/ml Parvovirüs-B19 DNA saptandı, serolojik analizinde Parvovirüs-B19 IgM negatif olarak belirlendi. Parvovirüs-B19 DNA negatif üç gebede IgG pozitifken IgM negatif bulundu; bir hastada IgG ve IgM negatif bulundu; bir hastada IgG negatifken, IgM "grey zone" olarak değerlendirildi, bir hastaya ait serolojik analiz sonuçlarına ulaşılamadı. IgG negatifken IgM 2-4 hafta sonra testin yinelenmesi önerilerek, grey zone olarak değerlendirilen hastada 8. haftada düşük gerçekleşti. Parvovirüs-B19 DNA saptanan hastanın kromozom analizi sonucunun normal olarak değerlendirildiği ve bebeğin sağlıklı bir şekilde dünyaya geldiği görüldü. Çalışmaya dâhil edilen diğer gebelerden üçünün gebeliğinin fetal anomali nedeniyle sonlandırıldığı, iki hastanın hidrops fetalis, iki hastanın fetal distres, bir hastanın fetal hidrotoraks tanısı aldığı, iki hastada ise gebeliğin normal olarak sonlandığı görüldü.

Sonuç: Serolojik analiz sonuçları negatif olsa bile Real-Time-PCR yöntemi ile 10 kopya/ml'ye kadar Parvovirüs-B19 DNA'sı saptanabilmekte ve kantitatif sonuç verilebilir. Gebelerde Parvovirüs-B19 DNA varlığının ve miktarının Real-Time PCR yöntemi ile saptanmasının, fetal Parvovirüs-B19 enfeksiyonunun erken tanısı ve takibi açısından önemli olacağı unutulmamalıdır.

Anahtar kelimeler: Human Parvovirüs B19, gebe, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR)

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to retrospectively investigate the presence of Parvovirus B19-DNA in pregnant women diagnosed with fetal anomaly and hydrops fetalis and its association with fetal infection and viral load.

Method: Twelve clinical samples of eleven patients referred to our laboratory between July 2014-March 2018 were included in the study. Parvovirus B19-IgM and IgG antibodies and were evaluated by ELISA (NovaTec, Germany) and the presence of Parvovirus-B19 DNA was quantitatively investigated by Real-Time PCR (LightMix® Kit Parvovirus B19, Roche, Germany).

Results: Parvovirus-B19 DNA-positivity was identified in 2 of 12 (16.7%) samples. Parvovirus-B19 DNA was detected in both amniotic fluid and serum samples, which were simultaneously taken from 22-week pregnant women with fetal anomalies with 10⁶ copies/ml and with 10³ copies/ml, respectively. Parvovirus-B19 was detected as IgM negative in serological analysis. When IgG was negative, serological test for IgM was recommended to be repeated 2-4 weeks later, and a miscarriage occurred in the 8th gestational week of a woman whose IgM was evaluated as being in "grey zone". Chromosome analysis of one of the patients, whom Parvovirus-B19 DNA was detected, was considered normal and a healthy baby was born. Pregnancy was terminated in three other pregnant included in the study due to the presence of fetal anomalies. The pregnancies were terminated due to the diagnosis of hydrops fetalis in 2, and fetal distress in 2, fetal hydrothorax in 1 patient, while two patients had term deliveries.

Conclusion: Even if the results of serological analysis were negative, Parvovirus B19-DNA can be quantitatively detected up to 10 copies/ml by Real-Time-PCR. It should not be forgotten that detection of the presence and viral load of Parvovirus B19-DNA by Real-Time PCR is quite important in terms of early diagnosis of fetal Parvovirus B19 infection in pregnancies.

Keywords: Human Parvovirus B19, Pregnant, Real-time polimerase chain reaction (Real Time PCR)

Alındığı tarih / Received:

01.06.2020 / 1.June.2020

Kabul tarihi / Accepted:

04.01.2021 / 04.January.2021

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

M. Çolak 0000-0001-9876-935X

A. Altay Koçak 0000-0002-0451-0142

D. Karçaaltıncaba 0000-0001-7834-3343

I. Fidan 0000-0001-6296-5017

G. Bozdayı 0000-0002-6036-6819

✉ gbozdayı@hotmail.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

Parvovirüs B19, Parvoviridae familyasının Erythrovirus genusunda yer alan zarfsız, ikozahedral kapsid simetrikli, küçük bir DNA virüsüdür. Parvovirus B19, Cossart ve ark.⁽¹⁾ tarafından 1975 yılında tanımlanmış, gebelerde prenatal tanısı Naides ve ark.⁽²⁾ tarafından 1989 yılında yapılmıştır.

Parvovirüs B19'un solunum sekresyonları, kan, kan ürünleri veya organ nakli ile bulaşması sonrasında, 4-14 gün içinde virüse karşı immün yanıt ve antijen-antikor kompleksleri ortaya çıkar. Hastalığın ikinci haftasında hâlsizlik, ateş, miyalji, artraljiler ve özellikle yüzde daha belirgin olan yaygın makülopapüler döküntüler görülür. Parvovirüs B19 asemptomatik enfeksiyon, eritema infeksiyozum; immünsüpre hastalarda ağır anemilerin yanı sıra aplastik kriz, pansitopeni, ensefalit, artrit ve gebelerde fetal enfeksiyonlara neden olabilir^(3,4).

Gebelik sırasında Parvovirüs B19 enfeksiyonu geçiren kadınların %50-84'ünde enfeksiyon asemptomatik seyrederek^(3,5). Semptomatik veya asemptomatik parvovirüs enfeksiyonunda Parvovirüs B19 plasenta aracılığıyla bebeğe geçerek konjenital enfeksiyona neden olabilir. Konjenital enfeksiyon sonucunda bebekte hidrops fetalis, fetal anemi, nonimmün hidrops, düşük ve ölü doğum görülebilir. Ancak, sıklıkla gebelik normal seyrinde devam eder ve sağlıklı bir bebek doğar^(6,7).

Virüsün plasenta yoluyla bebeğe geçişinin tüm gebelik süresince görülebildiği, ancak ilk trimesterde daha sık olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾. Parvovirüs B19 enfeksiyonunda fetüsün kliniği, bulaşmanın olduğu gebelik haftası ile ilişkili olarak değişiklik gösterir. Gebeliğin ilk trimesterında geçirilen enfeksiyonda fetal hidrops, fetal anemi, intrauterin fetüs ölümü görülebilir. İkinci ve üçüncü trimesterde geçirilen enfeksiyonlarda ise fetal enfeksiyon riski düşük olup, düzenli olarak, fetal hidrops bulguları, asit, kardiyomegali ve polihidramniosiz açısından bebeğin ultrason takipleri yapılmalıdır^(3,4). Gebelikte geçirilen Parvovirüs B19 enfeksiyonunda ilk 20 haftanın önemini vurgulayan çalışmalar mevcuttur. Etkilenen fetusların spontan

kayıp oranı gebeliğin 20. haftasından önce %14.8; 20. haftadan sonra %2.3 olarak bildirilmiştir^(8,9).

Gebelikte Parvovirüs B19 enfeksiyonunun serolojik tanısında serum ve fetal kanda IgM ve IgG antikorları aranır. Antikor yanıtta, IgG pozitifken IgM antikorlarının negatif olması geçirilmiş enfeksiyonu gösterir ve fetüs Parvovirüs B19 enfeksiyonuna karşı korunur. Akut enfeksiyonun göstergesi IgM pozitifliğidir, ancak yapılan çalışmalarda, akut Parvovirüs B19 enfeksiyonu geçiren gebelerde IgM antikorlarının %3-19'unda pozitifleştiği gösterilmiştir^(5,10). Fetusta immün yanıt (IgM) 22. haftadan itibaren saptanabildiği için fetal kanda IgM aranması Parvovirüs B19 enfeksiyonunun tanısı için uygun olmaz⁽¹¹⁾. Hızlı maternal klerens, yeterli immün yanıt oluşmaması veya geç oluşması nedeni ile maternal ve fetal IgM antikorlarının saptanamaması Parvovirüs B19 enfeksiyonunun serolojik tanısını güçleştirir.

Moleküler yöntemler ile serolojik analiz sonuçları negatif olsa bile Parvovirüs B19 DNA'sı tespit edilebilir. Günümüzde Real-Time PCR yöntemi ile 10 kopya/ml'ye kadar Parvovirüs B19 DNA'sı saptanabilmekte ve kantitatif sonuç verilebilir. Gebelerde Parvovirüs B19 DNA varlığının ve miktarının Real-Time PCR yöntemi ile saptanması, in-utero Parvovirüs B19 enfeksiyonunun erken tanısı ve takibi açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, retrospektif olarak, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinden, fetal anomali ve hidrops fetalis tanısı almış ve Parvovirüs B19 enfeksiyonu şüphesiyle laboratuvarımıza gönderilen örneklerde, Parvovirüs B19 DNA pozitifliğini Real Time-PCR yöntemi ile araştırarak; fetal enfeksiyonun, virüs ve viral yük ile ilişkisini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Temmuz 2014–Mart 2018 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen altı serum örneği, altı amniyon sıvısı olmak üzere, on bir gebeye ait; on iki klinik örnek çalışmaya dâhil edilmiştir. Bir

hastada ait amnion sıvısı ve serum örneği eş zamanlı olarak çalışılmıştır.

Serolojik Analizler: Serum örneklerinde; Parvovirüs B19 IgM ve IgG antikorları ELISA yöntemi ile (NovaTec, Almanya) üreticinin talimatları doğrultusunda çalışılmıştır. Çalışmanın sonunda mikropalak, spektrofotometrede (TECAN, İsviçre) 450 nm dalga boyunda okutularak elde edilen optik dansite (OD) sonuçları değerlendirilmiştir. Üreticinin talimatlarına göre, IgM ve IgG testleri için $0.15 < \text{cut-off kontrol OD} < 1.30$; negatif kontrol OD < 0.2 , pozitif kontrol OD $> \text{cut off}$ ise testin doğru çalıştığı kabul edilmiştir. Eşik değerin (cut-off) %10 altındaki değerler negatif, %10 üstündeki değerler pozitif olarak, %10 aralığındaki değerler ise 2-4 hafta sonra testin tekrarlanması önerilerek, "grey zone" olarak değerlendirilmiştir. Kit prospektüsünde, duyarlılığının ve özgüllüğünün $> 95\%$ olduğu belirtilir.

Nükleik Asit İzolasyonu ve Viral DNA Amplifikasyonu: Klinik örneklerde Parvovirüs B19 DNA varlığı Real-Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Nükleik asit izolasyonu "MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kiti" (Roche, Almanya) kullanılarak "MagNA Pure Compact Instrument" (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. Viral DNA eldesi, üretici firmanın protokolü doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar amplifikasyon yapılana kadar -80°C 'de korunmuştur. Amplifikasyon, Parvovirüs B19 genomunun ORF2 bölgesinin 184 bp'lik kısmını amplifiye eden primerleri içeren Light Mix® Kit Parvovirus B19 (TIB Molbiol GmbH, Almanya) kullanılarak LightCycler®2.0 (Roche Applied Science, Almanya) cihazında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile yapılmıştır. Üretici firma tarafından kitin alt saptama sınırı 10 kopya/ml olarak belirtilmiştir.

Analizlerde kullanılan negatif kontrollere ait eğrilerde pik görülmemiştir. Negatif sonuçların değerlendirilmesi ve analizlerin doğruluğunun kontrolü internal kontrol ile LightCycler®2.0 (Roche Applied Science, Almanya) cihazının 705 kanalında "absolute quantification" ve "melting curve" analizi yapılarak sağlanmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden laboratuvarımıza gönderilen, on bir gebeye ait; on iki klinik örnek Real-Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Klinik örneklerin %50 (6/12)'si serum, %50 (6/12)'si amnion sıvısı olup, bir hastaya ait amnion sıvısı ve serum örneği eşzamanlı olarak çalışılmıştır. Çalışılan klinik örneklerin toplam %16.7 (2/12)'sinde Parvovirüs B19 DNA pozitifliği saptanmış, pozitif örneklerin %16.7 (1/6)'sinin serum, %16.7 (1/6)'sinin amnion sıvısı olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Parvovirüs B19 enfeksiyonu şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen gebelerin tanımlanamayan ateş, kırgınlık, yorgunluk, ekstremitte ağrısı yakınmalarının olduğu ve polip, endometrium düzensizliği ve uterusun enflamatuvar olmayan hastalıkları, fetüslerin; hidrops fetalis, fetal anomali, fetal hidrotoraks, fetal distres ve polihidroamniyoz gibi tanılar aldıkları görülmüştür. Gebelerin hiçbirinde döküntü yakınması olmamıştır.

Çalışmamızda, beş hastaya ait Parvovirüs B19 IgM ve IgG antikor pozitifliği araştırılmış, bir hastaya ait serolojik analiz sonucuna ulaşılamamıştır. Üç hastada IgG pozitifken IgM negatif bulunmuş, bir hastada IgG ve IgM negatif bulunmuş; bir hastada IgG negatifken IgM 2-4 hafta sonra testin yinelenmesi önerilerek, grey zone olarak değerlendirilmiştir. Ancak, takiplerde hasta yine gelmemiş, 8. haftada düşük söz konusu olmuştur. Çalışmamızda, Parvovirüs B19 DNA pozitifliği saptanan gebelerde Parvovirüs B19 IgG pozitif olarak bulunurken, Parvovirüs B19 IgM negatif olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

Fetal anomali saptanmış 22 haftalık bir gebeye Parvovirüs B19 enfeksiyonu şüphesi ile amniyosentez yapılmış, amnion sıvısı ve serum örneği eşzamanlı olarak çalışılmıştır. Hastadan alınan amnion sıvısı ve serum örneklerinde Parvovirüs B19 DNA pozitifliği saptanmış olup, amnion sıvısında 10^6 kopya/ml, serum örneğinde 10^3 kopya/ml Parvovirüs B19 DNA belirlenmiştir (Tablo 2). Eşzamanlı olarak araştırılan amnion sıvısı ve serum örneğinde saptanan Parvovirüs B19 DNA kopya sayısı incelendiğinde,

Tablo 1. Anne, fetal tanı ve Parvovirüs B19 laboratuvar sonuçları.

Yaş	Gebelik Haftası	Gebelik Sonlanması	Fetus	Fetal Tanı	Parvovirüs B19			Klinik Örnek	
					DNA	IgM	IgG		
Hasta 1	36	25	Sezaryen	IU EX	Hidrops fetalis	(-)	(-)	(+)	Serum
Hasta 2	23	22	Normal doğum	Sağlıklı	Fetal anomali riski*	(+)	(-)	(+)	Amniyon sıvısı/Serum
Hasta 3	28	8	Düşük	IU EX	UEOB, Polip, Endometrium düzensizliği	(-)	Gri zon	(-)	Serum
Hasta 4	26	25	Sezaryen	IU EX	Hidrops fetalis*	(-)	-	-	Amniyon sıvısı
Hasta 5	34	30	Sezaryen	Sağlıklı	Fetal hidrotoraks* Polihidroamniyoz	(-)	-	-	Amniyon sıvısı
Hasta 6	37	14	Normal doğum	Sağlıklı	Fetal anomali riski	(-)	(-)	(+)	Serum
Hasta 7	24	22	Sezaryen	IU EX	Fetal anomali	(-)	-	-	Amniyon sıvısı
Hasta 8	29	12	Sezaryen	Sağlıklı	Fetal distres	(-)	(-)	(-)	Serum
Hasta 9	27	23	Sezaryen	IU EX	Fetal distres	(-)	-	-	Serum
Hasta 10	35	24	Sezaryen	IU EX	Fetal anomali	(-)	-	-	Amniyon sıvısı
Hasta 11	23	25	Normal doğum	Sağlıklı	Fetal anomali riski	(-)	-	-	Amniyon sıvısı

IU EX: Intrauterin eksitus

UEOB: Uterusun enflamatuvar olmayan bozuklukları

*Amniyosentez yapılmış, kromozom analizi sonucu normal olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Parvovirüs B19 DNA pozitif örneklerde saptanan DNA miktarı ve klinik tanı.

Klinik Örnek	Parvovirüs B19 DNA (kopya/ml)	Klinik	Parvovirüs B19 IgM	Parvovirüs B19 IgG
Serum	10 ³	Fetal anomali	(-)	(+)
Amniyon sıvısı	10 ⁶	riski		

amniyon sıvısında seruma oranla daha yüksek miktarda Parvovirüs B19 DNA olduğu görülmüştür. Hastanın kromozom analizi istenmiş ve fetüsün kromozom analizi sonucu "normal" olarak değerlendirilmiştir. Parvovirüs B19 DNA pozitifliği saptanan fetüste gebelik süreci normal seyrinde ilerlemiş, bebek sağlıklı bir şekilde dünyaya gelmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen gebelerin üçünde fetal anomali nedeniyle gebelik sonlandırılmış, bir gebede 8. haftada düşük gerçekleşmiş, iki fetüs; hidrops fetalis, iki fetüs; fetal distres, bir fetüs; fetal hidrotoraks tanısı almış, üç gebede ise gebelik normal olarak sonlanmıştır.

TARTIŞMA

Human Parvovirüs B19 tüm dünyada ve tüm yaş gruplarında yaygın olarak görülür. Sağlıklı bireylerde %30-60 olan Parvovirüs B19 seroprevalansının hamilelerde gebeliğe bağlı immünsüpresyon nedeniyle

%85'e kadar yükseldiği belirtilmiştir^(12,13). Çalışmamızda, retrospektif olarak, kadın hastalıkları ve doğum kliniğinden laboratuvarımıza gönderilen gebelere ait klinik örneklerde Real-Time PCR yöntemiyle Parvovirüs B19 DNA varlığı araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, Parvovirüs B19 enfeksiyonunda fetüsün kliniğinin, bulaşmanın olduğu gebelik haftası ile ilişkili olarak değişiklik gösterdiği belirtilmekte, gebeliğin 20. haftasından sonra karşılaşılan Parvovirüs B19 enfeksiyonunda fetal kayıp oranı %2.3 olarak bildirilmektedir^(8,9). İsveç'te 33.759 gebe ile yapılan bir çalışmada, üçüncü trimesterdeki Parvovirüs B19 enfeksiyonuna bağlı fetal kayıp oranı %0.3 olarak belirtilmiştir⁽¹⁴⁾. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Parvovirüs B19 enfeksiyonuna bağlı gelişen ve spontan olarak düzelen bir hidrops fetalis tanısı almış fetüs olgusu bildirilmiştir⁽⁷⁾. Çalışmamızda, Parvovirüs B19 DNA saptadığımız 22 haftalık gebe hastada gebelik normal seyrinde sonlanmış ve sağlıklı bir bebek doğmuştur. Gebelerde Parvovirüs B19'un varlığından şüphelenildiğinde Real Time-PCR yöntemi ile Parvovirüs B19 DNA pozitifliği aranmalı ancak, gebeliğin 20. haftasından sonra karşılaşılan Parvovirüs B19 enfeksiyonunda fetüsün etkilene oranının düşük olduğu unutulmamalıdır.

Çalışmamızda, 7. gebelik haftasındaki bir gebede Parvovirüs B19 DNA'sı ve IgG'si negatifken IgM "grey

zone" olarak değerlendirilmiş, olası Parvovirüs B19 pozitifliği nedeniyle 2-4 hafta sonra testin yinelenmesi önerilmiştir. Ancak, 8. haftada düşük söz konusu olmuş ve hasta yine gelmemiştir. Hasta, yapılan ultrasonografik inceleme sonucunda, uterin polip ve endometrial düzensizlik tanısı almıştır. Gebelikte geçirilen Parvovirüs B19 enfeksiyonundan sonra fetal enfeksiyon riskinin yaklaşık %31 olduğu ve özellikle gebeliğin ilk trimesterında geçirilen enfeksiyonun bebekte fetal anemi, hidrops fetalis, düşük ve ölü doğuma neden olabileceği bildirilmiştir⁽¹⁵⁾. Enders ve ark.⁽⁶⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, Parvovirüs B19 enfeksiyonu saptanan gebelerde, %6.3 oranında fetal kayıp olduğu ve fetal kayıpların tamamının ilk 20 haftada gerçekleştiği belirtilmiştir. Çalışmamızda, serolojik analiz sonucu (Parvovirüs B19 IgM) grey zone olarak değerlendirilen gebede, 8. haftada düşük gerçekleşmesi, PCR sonucu negatif olmasına rağmen, Parvovirüs B19 enfeksiyonunu düşündürmüştür. Moleküler yöntemlerin güvenilirliğinin artmış olduğu bilinmektedir ancak, örnek transportu, laboratuvara ulaşması ve bu aradaki bekleme süresi vb. ile ilgili olarak negatif sonuç bulunulabileceği unutulmamalıdır.

Çalışmamızda, Parvovirüs B19 DNA pozitifliği saptanmamış, ancak hidrops fetalis, fetal distres ve fetal anomali tespit edilen ve intrauterin ölüm gerçekleşen beş gebede, gebelik çeşitli haftalarda sonlandırılmıştır. Ancak, fetal anomali, fetal hidrotoraks, fetal distres tanısı alan dört gebede ise, gebelik herhangi bir sıkıntı olmaksızın normal seyrinde devam etmiş ve sağlıklı bebekler doğmuştur. Parvovirüs şüphesi olan gebelerin yaklaşık yarısında herhangi bir sorun olmaksızın doğum söz konusu olmuştur. Gebelerin hiçbirinde döküntü olmamıştır.

Çalışmamızda eşzamanlı olarak Parvovirüs B19 DNA belirlenen gebede amniyon sıvısı örneğinde 10^6 kopya/ml, serum örneğinde 10^3 kopya/ml Parvovirüs B19 DNA saptanmıştır. Ishikawa ve ark.⁽¹⁶⁾ Parvovirüs B19 enfeksiyonu saptanan hamile kadınların serum ve amniyon sıvısında Parvovirüs B19 DNA miktarını araştırmış, serum örneklerinde 10^4 - 10^5 kopya/ml; amniyon sıvılarında 10^7 - 10^8 kopya/ml Parvovirüs B19 DNA belirlemişlerdir. Çalışmada eşzamanlı olarak test edilen amniyon sıvısı ve serum örneklerinden,

amniyon sıvısında daha yüksek miktarda Parvovirüs B19 DNA saptanmış ve fetal serum örneği yerine amniyon sıvısında PVB 19 DNA aranması önerilmiştir. Hastanemizde gebelikte Parvovirüs B19 enfeksiyonu saptanması fetustan alınan serum örneği yerine amniyon sıvısı örneği tercih edilmektedir.

Çalışmamızda, Parvovirüs B19 DNA pozitifliği saptanan serum örneğinde IgG pozitifken, IgM negatif bulunmuştur. Akut enfeksiyonun göstergesi IgM pozitifliğidir, ancak akut Parvovirüs B19 enfeksiyonu geçiren gebelerin %3-19'unda, IgM antikollarının pozitifleştiği ve serolojik analiz sonuçlarının yanlış negatifliğe neden olabileceği bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Yozgat ve ark.⁽⁷⁾, IgM'si negatif olması nedeni ile önce Parvovirüs B19 enfeksiyonu tanısı koyamadıkları fakat annenin geçirilmiş enfeksiyon etiolojisine yönelik sorgulamasında eritema enfeksiyozum benzeri döküntü olması nedeni ile yine değerlendirdikleri ve PCR yöntemi ile Parvovirüs B19 DNA pozitifliği saptayarak tanı koyabildikleri bir fetüs olgusu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, Parvovirüs B19 DNA pozitif hastada, akut enfeksiyon belirtici olan IgM antikorunun negatif bulunması, gebelerde Parvovirüs B19 enfeksiyonunun tanısında serolojik yöntemlerin kullanımının, Parvovirüs B19 enfeksiyonu tanısını dışlamayacağını destekler.

Sonuç olarak, gebelikte geçirilen parvovirüs enfeksiyonunda Parvovirüs B19 plasenta aracılığıyla bebeğe geçerek konjenital enfeksiyona neden olabilmekte ve bebekte hidrops fetalis, fetal anemi, nonimmün hidrops, düşük ve ölü doğum görülebilir. Gebeliğe bağlı immünsüpresyon nedeniyle Parvovirüs B19 enfeksiyonunda gebelere ait serolojik analiz sonuçları pozitif olmayabilir^(7,10). Dolayısıyla serolojik analiz sonuçları negatif olsa bile, anne ve fetustaki şüpheli durumlarda amniyon sıvısı veya serum örneğinde, tercihen fetal Parvovirüs B19 enfeksiyonunu belirleyebildiğimiz materyal amniyon sıvısı olduğu için amniyon sıvısında, Parvovirüs B19 DNA varlığının ve miktarının Real-Time PCR yöntemi ile aranması gerektiği mutlaka akılda tutulmalıdır.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Gazi Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun,

25/06/2018 tarih ve 496 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Finansal Destek: Finansal destek bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by Gazi University non-invasive clinical ethical committee (06.25.2018/496).

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

Funding: Financial support is not declared.

KAYNAKLAR

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1975;305(7898):72-3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)91074-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)91074-0)
2. Naides SJ, Weiner CP. Antenatal diagnosis and palliative treatment of non-immune hydrops fetalis secondary to fetal parvovirus B19 infection. *Prenat Diagn*. 1989;9(2):105-14. <https://doi.org/10.1002/pd.1970090205>
3. Kaşifoğlu N, Us T. Parvovirus B19 infections in pregnant women and neonates. *J Gynecol Obst*. 2016;26(2):103-8. <https://doi.org/10.5336/gynobstet.2013-38434>
4. Nayeri UA, Bahtiyar MO. Parvovirus B19 infection during pregnancy. In: Copel J (ed) *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care*. New York: Elsevier, 2018:685-8.
5. Brkic S, Bogavac MA, Simin N, Hrnjakovic- Cvetkovic I, Milosevic V, Maric D. Unusual high rate of asymptomatic maternal parvovirus B19 infection associated with severe fetal outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24(4):647-9. <https://doi.org/10.3109/14767058.2010.511330>
6. Enders M, Weidner A, Rosenthal T, et al. Improved diagnosis of gestational parvovirus B19 infection at the time of nonimmune fetal hydrops. *J Infect Dis*. 2008;197(1):58-62. <https://doi.org/10.1086/524302>
7. Yozgat Y, Kurtulmuş S, Öner T, et al. PZR metodu ile saptayabildiğimiz parvovirüs B19 enfeksiyonuna bağlı gelişen ve spontan olarak düzelen hidropslu fetüs. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst*. 2013;23(1):49-52. <https://www.jcog.com.tr/journal/issue/2013/23/1-0/en-index.html>
8. Goff M. Parvovirus B19 in pregnancy. *J Midwifery Womens Health*. 2005;50(6):536-8. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2005.06.008>
9. Bonvicini F, Puccetti C, Salvi NC, et al. Gestational and fetal outcomes in B19 maternal infection: a problem of diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10):3514-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.00854-11>
10. Kara M, Balcı M, Yapça ÖE, Yılmaz N. Gebelikte Parvovirus B 19 Enfeksiyonu: Klinik seyir ve prognoz. *JOPP Derg*. 2013;5(1):1-6. <https://doi.org/10.5222/JOPP.2013.001>
11. Ornoy A, Ergaz Z. Parvovirus B19 infection during pregnancy and risks to the fetus. *Birth Defects Res*. 2017;109(5):311-23. <https://doi.org/10.1002/bdra.23588>
12. Chan LW, Lau TK, Chung TK. Fetal anaemia as a cause of fetal injury: diagnosis and management. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18(2):100-5. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000192981.69352.dc>
13. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):485-505. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.485-505.2002>
14. Skjöldebrand SL, Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Wahren B, Broliden K, Nyman M. Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *Br J Obstet Gynaecol*. 2000;107(4):476-80. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2000.tb13265.x>
15. Puccetti C, Contoli M, Bonvicini F, et al. Parvovirus B19 in pregnancy: possible consequences of vertical transmission. *Prenat Diagn*. 2012;32(9):897-902. <https://doi.org/10.1002/pd.3930>
16. Ishikawa A, Yoto Y, Asakura H, Tsutsumi H. Quantitative analysis of human parvovirus B19 DNA in maternal and fetal serum, and amniotic fluid during an early stage of pregnancy. *J Med Virol*. 2015;87(4):683-5. <https://doi.org/10.1002/jmv.24105>

Van İli Sınırları İçerisinde Van ve Erçek Gölü'nün Mikrobiyolojik Kirlilik Seviyesinin Belirlenmesi

Determination of Microbiological Pollution Level of Lake Van and Lake Erçek Situated within the Borders of Van Province

Elif Aydın*[Ⓜ], Mehmet Parlak**[Ⓜ], Hüseyin Güdücüoğlu**[Ⓜ], Yasemin Bayram**[Ⓜ]

*Halk Sağlığı Laboratuvarı, Van, Türkiye

**Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

Atıf/Cite as: Aydın E, Parlak M, Güdücüoğlu H, Bayram Y. Van ili sınırları içerisinde Van ve Erçek Gölü'nün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):132-42.

Öz

Amaç: Van Gölü, bölgenin en önemli rekreasyon alanlarından biridir. Göl'ün mikrobiyolojik kirlilik açısından araştırılması halk sağlığı için çok önemlidir. Bu çalışmada, Van ilinin sınırları içinde bulunan Van ve Erçek Gölü'nün mikrobiyolojik kirlilik varlığının ve oranının saptanması, insan sağlığını ve çevreyi korumak üzere, yüzme ve rekreasyon amaçlı kullanılan bu suların kalitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 29 farklı noktadan alınan örneklerde fekal koliform, toplam koliform ve enterokok varlığı araştırılmıştır.

Yöntem: Haziran-Eylül 2015 tarihleri arasında, önceden belirlenen 29 noktadan iki haftada bir olmak üzere 232 adet su örneği, Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği (76/160/AB) ek: 5 maddesine uygun olarak, 300-500 ml'lik steril plastik şişelere alınarak Van İl Halk Sağlığı Laboratuvarı'na iletildi. Örneklerin koliform ve enterokok yönünden analizi için membran filtrasyon yöntemi kullanıldı. Yüzme suyu kalitesi yönetmeliğine göre zorunlu değerler fekal koliform, toplam koliform ve enterokok için sırasıyla 2000 kob/100 ml, 10.000 kob/100 ml ve 1000 kob/100 ml olarak alındı. Alınan su örneklerinde fekal koliform, toplam koliform ve enterokok türlerinden herhangi birinin zorunlu değerlerin üzerinde saptanması durumunda, söz konusu su örneği kötü kalite olarak değerlendirildi.

Bulgular: Alınan toplam 232 su örneğinin 196'sında (%84) herhangi bir bakteriyel kirlilik bulunmazken, 36 örneğin (%16) fekal koliform, toplam koliform ve enterokok türleri ile kontamine olduğu belirlendi. Örnek alınan 29 sahilden 17'sinde (%71) en az bir veya daha fazla örnekte kötü kaliteli su belirlendi.

Sonuç: Mikrobiyolojik kirlilik saptanan yerlerin kullanımının kısıtlanarak önlem alınması öngörüldü. Ayrıca belirtmek gerekir ki, analizlerin düzenli olarak yapılması halk sağlığı açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Yüzme suyu kalitesi, halk sağlığı, bakteriyolojik kirlilik, koliform bakteri

ABSTRACT

Objective: Lake Van is one of the most important recreation areas of the region. Investigation of microbiological pollution of Lake Van is very important for public health. The aim of this study is to assess the microbiological pollution and determine water quality of the lakes Van and Erçek situated within Van Province, which are used for swimming and recreation to protect both human and environmental health. For this purpose, the presence of fecal coliform, total coliform and enterococci were investigated in samples taken from 29 different points of the lakes.

Method: Between June and September 2015, 232 water samples were taken from predefined 29 points, every two weeks, and sent to the Public Health Laboratory of Van Province in 300-500 mL sterile plastic bottles in accordance with Bathing Water Quality Regulation (76/160 / EU: add-on clause 5. Membrane filtration method was used to analyze the samples for coliform bacilli and enterococci. Mandatory values according to bathing water quality regulation were taken as 2000 cfu/100 ml, 10000 cfu/100 ml and 1000 cfu/100 ml for fecal coliform, total coliform and enterococcus, respectively.

Results: In 196 (84%) of 232 water samples collected, no bacterial contamination was found, while 36 (16%) samples were found contaminated with fecal coliform, total coliform and Enterococcus species. At least one or more specimens of poor quality water were detected in 17 of 29 sampled beaches.

Conclusion: It was envisaged to take precautions by restricting the use of the places where microbiological pollution was detected. In addition, regular analyzes are important for public health.

Keywords: Bathing water quality, public health, bacteriological pollution, coliform bacteria

Alındığı tarih / Received:

01.06.2020 / 1.June.2020

Kabul tarihi / Accepted:

04.01.2021 / 04.January.2021

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

E. Aydın 0000-0003-0877-453X

M. Parlak 0000-0001-6030-2244

H. Güdücüoğlu 0000-0003-1101-9017

Y. Bayram 0000-0001-6083-5550

✉ elifkn@hotmail.com

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

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

GİRİŞ

Su kaynaklarının önemli bir kullanım alanı olan yüze suları, rekreasyonel ve turizm sahası olarak da kullanılmakta, gittikçe daha ekonomik ve sosyolojik öneme sahip olmaktadır. Fakat bu ortamların fazla kullanılmasından ötürü diğer bölgelere göre daha yoğun bir nüfusa sahip olması nedeniyle daha fazla kirlenmektedir⁽¹⁾.

Koliform grubu bakteriler, Enterobacteriaceae familyasında olan, fakültatif anaerob, Gram negatif, sporsuz, 35°C'de 48 saatte laktozdan gaz ve asit oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir^(2,3). Koliform grubu bakteriler içinde fekal koliform olarak tanımlanan bakterilerin büyük çoğunluğunun, *Escherichia coli* olduğu bilinir. Bu grup bakteriler içinde yalnızca *E. coli*, doğrudan dışkı ile ilişkilendirilirken, diğer koliform bakteri üyeleri bitki, toprak ya da sıcakkanlı hayvan dışkısı kökenli olabilmektedir. Fekal kontaminasyon göstergesi olarak fekal koliformlardan birisi bulunabilir. Bir örnekte *E. coli* veya fekal koliform görülmesi, örneğe direkt veya dolaylı yollardan dışkı bulaştığının ve *Salmonella* ve *Shigella* patojenlerin de olabileceğinin bir göstergesidir. Bu nedenle içme ve kullanma sularında, gıda maddelerinde, deniz ve göllerde *E. coli* ve fekal koliform bulunmaması gerekirken, bazı gıdalarda belirli miktarda koliform bakteri bulunmasına izin verilebilmektedir^(2,3).

Bakteriyolojik su kalitesine iki amaçla için bakılır. Bunlar indikatör bakterilerin tayini ve kirletici nüfusun yaklaşık sayısının belirlenmesidir. İndikatör bakteriler, koliform grup bakteriler ve enterokoklardır^(3,4). Rekreasyonel için kullanılan sularda mikrobiyolojik kirlenme önemli bir sorundur. Patojen mikroorganizmalarla kirlenen suların kullanımı sağlık için tehlikeli olduğundan sınırlandırılmaktadır⁽⁵⁾.

Mikrobiyal kirlilik göl suyunun kullanımının sınırlandırılması, ekosistemi olumsuz yönde etkilemesi ve birçok salgın hastalığa yol açması ile birlikte halk sağlığını tehdit etmesi açısından da büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle özellikle son zamanlarda çoğu ülkede göl sularının mikrobiyal kalitesinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. İçme ve kullanma

sularının mikrobiyolojik kalite kriterlerinin uygunluğunu ve güvenilirliğini kontrol etmek amacıyla mikrobiyolojik analizler yapılmaktadır⁽⁶⁾.

Ülkemizin en büyük gölü olan, Van ve Bitlis il sınırları arasında bulunan Van Gölü, 3.574 km² yüzölçümü, 607 km³ hacmi ve yaklaşık 451 m derinliği olan dünyada en büyük sodalı gölü ve dördüncü büyük kapalı su havzasıdır. Yurdumuzda yalnızca Van Gölü'nde yaşayan inci kefali, göl etrafında yaşayan halk tarafından yoğun bir şekilde tüketilmektedir. Erçek Gölü havzası, Van Gölü'nün doğusunda yer almakta olup, 1.526 km² yüzölçümü ile suyunun özellikleri bakımından Van Gölü ile benzerdir.

Van ve Erçek Gölü çevresinde 500 binden fazla insan yaşamaktadır. Yaz mevsiminin gelmesiyle birlikte yerli halk, yerli ve yabancı turistler yüzmeye amacıyla plajları yoğun bir şekilde kullanırlar. İl Sağlık Müdürlüğü tarafından tanımlanmış 29 bölge yüzmeye amacıyla kullanılmaktadır. Tabakalaşma özelliği gösteren Van ve Erçek Gölü, gün geçtikçe artan oranda kirlenmeye maruz kalmaktadır. Koliform organizmalar uzun zamandan beri yüzmeye suyu kalitesinin mikrobiyolojik kontrolünde indikatör madde olarak kullanılmaktadır. Bunun en önemli nedeni, suda saptanmalarının ve değerlendirilmelerinin son derece kolay olmasıdır⁽⁷⁾. Van ilinde İl Sağlık Müdürlüğü tarafından her yıl Haziran ve Eylül tarihleri arasında on beş günlük periyotlar ile alınan örneklerde mikrobiyolojik analizler yapılmakta ve sonuçlara göre gerekli önlemler alınmaktadır.

Çalışmamızda, Haziran-Eylül 2015 tarihleri arasında Van ve Erçek Gölü'nün belirlenen 29 noktasından iki hafta aralıklarla 8 kez olmak üzere su örnekleri alınarak mikrobiyolojik kirlilik seviyesini saptamak için toplam koliform, fekal koliform ve enterokok açısından değerlendirildi. Van Gölü suyunun 29 farklı noktada yapılan analizlerle bölgelere göre hijyen kalitesinin ve insan-hayvan sağlığı üzerinde oluşturacağı düşünülen risklerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Su örneklerinin alınması: Van Gölü havzasının, Van ili

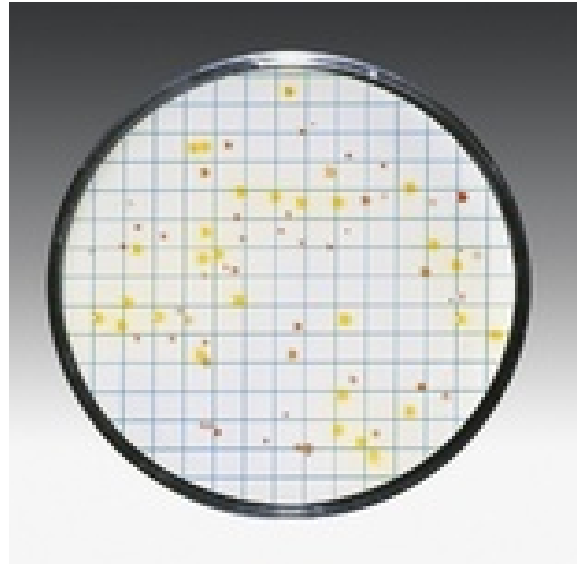
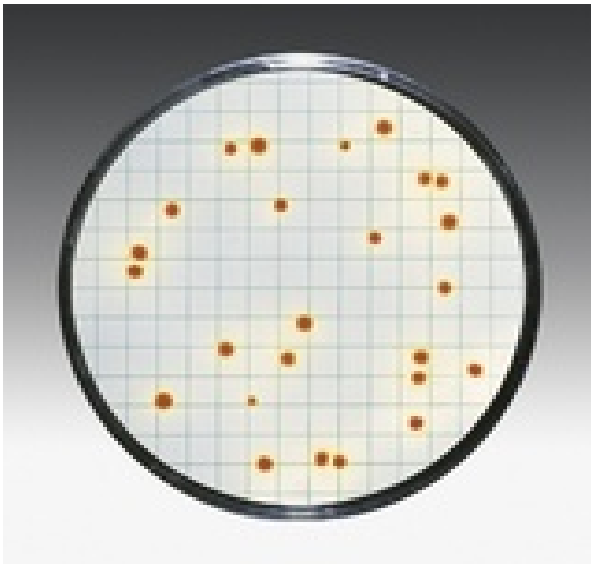
sınırları içerisinde UHM (İl Umumi Hıfzıssıhha Kurulu Meclisi) kararı ile İşkirt köyünden, Erciş ilçesi Çelebi-bağı sahiline kadar uzanan kısmında 28, Erçek Gölü sahilinde 1 adet olmak üzere toplam 29 yüzme alanı vardır. Yüzme ayları olan 1 Haziran-15 Eylül 2015 tarihleri arasında, 15 günde bir olmak üzere belirlenmiş olan 29 yüzme noktasından iki hafta aralıkla su örnekleri alınarak fekal koliform, toplam koliform ve enterokok varlığı araştırılmıştır. Toplam 232 adet su örneği Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği'ne (76/160/AB) uygun şekilde 300-500 ml'lik steril plastik örnek şişelerine alınmıştır⁽⁸⁾. Şişelerin ağzıları sıkıca kapatılmış ve soğuk zincirde, 8 saat içinde Van İl Halk Sağlığı Laboratuvarı'na ulaştırılarak analizleri yapılmıştır.

Su örneklerinin süzülmesi, kültürü ve değerlendirilmesi: Örneklerin enterokok ve koliform bakteri yönünden analizi için membran filtrasyon yöntemi kullanıldı⁽⁹⁾. Alınan 500 ml'lik su örnekleri her biri 100'er ml olmak üzere 3 ayrı örnek, por çapları 0.45 µm olan membran filtrede süzüldü. Su örneğinde incelenecek bakteriler membran filtre üzerinde toplandı. Membran filtrelerden ikisi Tegritol 1.3.5-trimetil-tetrazolyum klorür (Tegritol TTC, Sartorius) besiyerine konularak bir petri 37°C'lik, diğer petri de 44°C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üçüncü membran filtre ise Slanetz Bartley (SB, Himedia

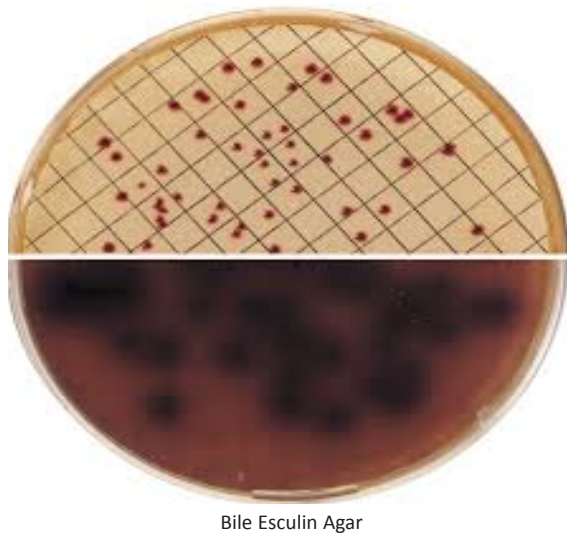
M612) besiyerine konularak 37°C'lik inkübatörde 48 saat bekletildi.

Fekal ve toplam koliformların doğrulama ve sayımı: Dışkı kaynaklı olan tüm üyeler "fekal koliform" olarak adlandırılır ve toplam koliform bakterilerin bir alt grubudur. Fekal koliform bakterilerin büyük çoğunluğunu *E. coli* suşları oluşturur⁽¹⁰⁾.

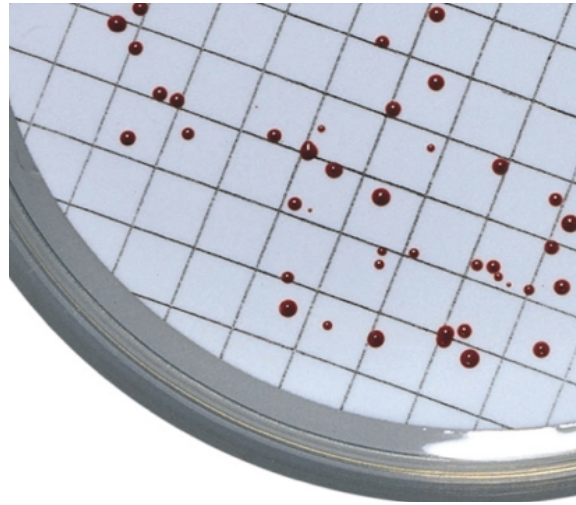
Fekal koliform grup bakterilerin belirlenmesi için özel bir besiyeri yoktur. Koliform bakteriler için kullanılan besiyerleri, 44.5±0.2°C sıcaklıkta inkübe edilerek fekal koliform bakteriler belirlenebilir. Tegritol besiyerinde filtre üzerinde bulunan ve aynı zamanda filtrenin altını sarartan tüm sarı koloniler TS EN ISO 9308-1 standardına göre şüpheli koliform kabul edilip doğrulamaya alındı⁽¹¹⁾. Şüpheli koloniler yeterli sayıda bölünmüş Trypticase Soy Agar (TSA, Oxoid) besiyerine pasajlanarak 36°C'de 24 saat süre ile inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen koloniler için oksidaz testi (Oxidase Strips, Oxoid) yapıldı. Koliform bakteriler oksidaz negatif olduğu için pozitif reaksiyon veren koloniler elendi. 44°C'de sayılan koloniler fekal koliform olarak değerlendirildi. 36°C'de sayılan koliform bakteriler ile 44°C'de sayılan fekal koliform bakterilerin tümü toplam koliform bakteri sayısı olarak verildi (Şekil 1).



Şekil 1. Tegritol TTC besiyerinde koliform bakterilerin koloni görünümü.



Bile Esculin Agar



Slanetz Bartley Agar

Şekil 2. Bile Esculin ve Slanetz Bartley Agar besiyerinde enterokok bakterilerin koloni görünümü.

Enterokokların doğrulama ve sayımı: Slanetz Bartley besiyerinde kırmızı, mor ve pembe renkte olan tüm bombeli koloniler TS EN ISO 7899-2 standardına göre olası enterokok olarak kabul edilip doğrulamaya alındı⁽¹²⁾. Tipik kolonilerin olduğu membran filtre steril pens yardımı ile ters çevrilmeden önceden 44°C'de bir saat bekletilmiş Safra Esculin Azid Agar (SEA, Oxoid) üzerine konularak 44°C'de iki saat süre inkübatörde bekletildi. Enterokoklar SEA'da bulunan eskulini hidrolize ederek, glukoz ve eskuletine dönüşür. Eskuletin, demir (III) iyonları ile zeytin yeşili-siyah renkli kompleks oluşturur. İnkübasyondan sonra koloni etrafında siyaha kadar değişen renkte zon oluşturan tüm koloniler enterokok olarak sayıldı (Şekil 2). Doğrulan ve sayılan koloniler "kob" (koloni oluşturan birim) olarak belirtildi.

Kötü kalite örnek: Yüzme suyu kalitesi yönetmeliğine göre fekal koliform parametresi yönünden zorunlu değer 2000 kob/100 ml, toplam koliform parametresi yönünden zorunlu değer 10.000 kob/100 ml ve enterokok parametresi yönünden zorunlu değer 1000 kob/100 ml, olarak alındı⁽⁸⁾. Alınan su örneklerinde analiz edilen bakteri türlerinden herhangi birisinin zorunlu değerlerin üzerinde belirlenmesi durumunda su örneği kötü kalite olarak değerlendirildi.

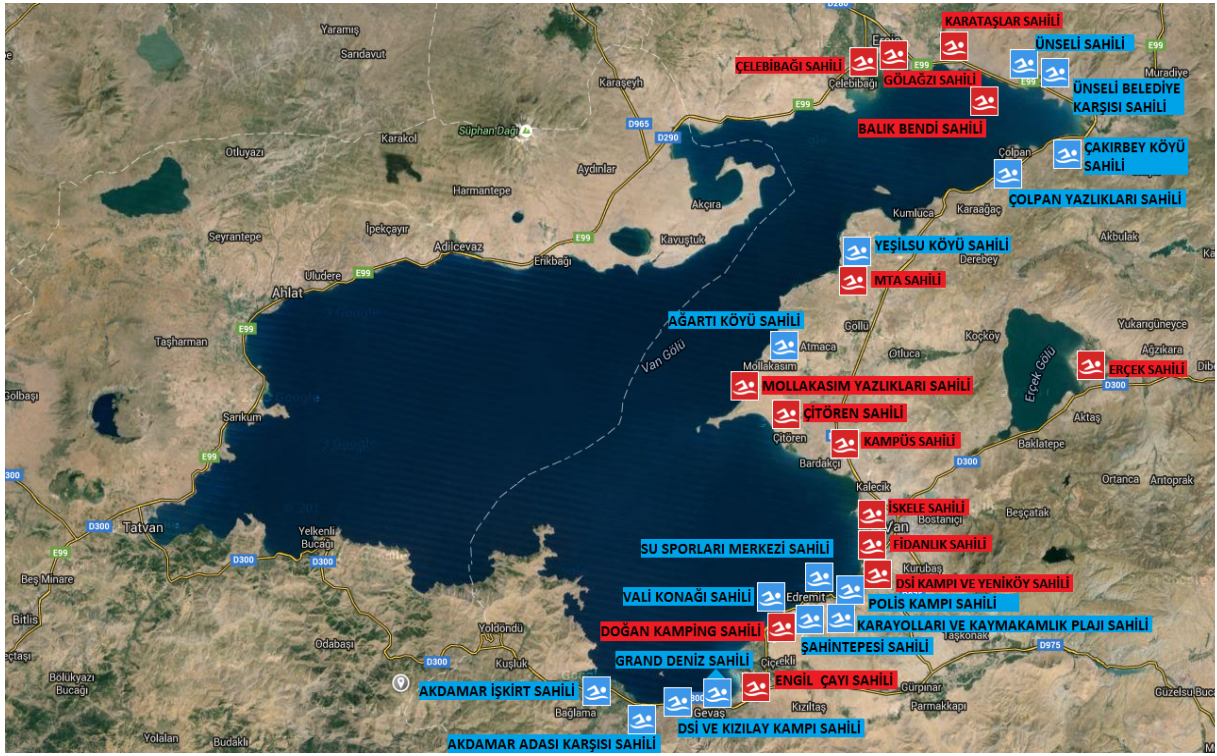
BULGULAR

Yüzme suyu kalitesi yönetmeliğine göre göl sularında aranan mikrobiyolojik parametreler açısından göl suları iki sınıfa ayrılır⁽⁸⁾. Bakteriolojik parametrelerin analiz sonuçlarına göre göl sularının kalite sınıflandırması Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Göl sularının kalite kriterleri (Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği (76/160/AB), 2006).

Parametre	İyi Kalite (kob/100 mL)	Kötü Kalite (kob/100 mL)
Fekal streptokok	<1000	<1000
Fekal koliform	<2000	<2000
Toplam koliform	<10000	<10000

Suyun kalitesinin, gölün bazı noktalarında iyi kalite olduğu, fekal kirliliğin yüksek olduğu bazı noktalarda ise kötü kalite olduğunu göstermiştir. Alınan toplam 232 su örneğinin 196'sında (%84) herhangi bir mikrobiyal kirlilik bulunmazken, 36 örneğin (%16) enterokok, fekal koliform ve toplam koliform bakterileri ile kontamine olduğu belirlendi. Göl suyu örneklerinin alındığı noktalar Şekil 3'teki haritada gösterildi; mavi renkte olanlar iyi kalite (yüzmeye uygun), kırmızı renkte olanlar ise kötü kalite (yüzmeye uygun değil) konumlarını göstermektedir.



Şekil 3. Su örneklerinin alındığı ve yüzmeye uygunluk/uygunsuzluk durumları.

Tablo 2. Örneklerin alındığı yerlere göre kötü kalite su saptanan hafta sayısı ve yüzdesi.

İstasyon Adı	Örnek Sayısı (n)	Kötü kalite su saptanan hafta [n, (%)
Fidanlık	8	6 (75)
Kampüs	8	5 (63)
MTA	8	5 (63)
İskele	8	3 (38)
Doğan Camping	8	2 (25)
DSİ kampı ve Yeniköy	8	2 (25)
Gölağzı	8	2 (25)
Karataşlar	8	2 (25)
Balıkbendi	8	1 (13)
Çelebibağı	8	1 (13)
Çitören Köyü	8	1 (13)
Engil Çayı	8	1 (13)
Erçek	8	1 (13)
Mollakasım Yazlıkları	8	1 (13)
Su Sporları Merkezi	8	1 (13)
Ünseli Belediye Karşısı	8	1 (13)
Vali Konağı	8	1 (13)
Ağartı Köyü	8	0 (0)
Akdamar Adası Karşısı	8	0 (0)
Akdamar İşkirt	8	0 (0)
Çakırbey Köyü	8	0 (0)
Çolpan Yazlıkları	8	0 (0)
DSİ ve Kızılay Kampı	8	0 (0)
Grand Deniz	8	0 (0)
Karayolları ve Kaymakamlık Plajı	8	0 (0)
Polis Kampı	8	0 (0)
Şahin Tepesi	8	0 (0)
Ünseli	8	0 (0)
Yeşilsu Köyü	8	0 (0)
Toplam	232	36

Tablo 3. Enterokok parametresinin ilçelere göre analiz sonuçları.

	Su örneğinin alındığı yer	Alınan örnek sayısı n (%)	Üreme görülmeyen örnek sayısı n (%)	Üreme görülen örnek sayısı n (%)	İyi kalite örnek sayısı n (%)	Kötü kalite örnek sayısı n (%)
İlçe	Muradiye	16 (7)	8 (11)	8 (5)	16 (8)	0
	Erciş	32 (14)	7 (10)	25 (16)	28 (14)	4 (13)
	Gevaş	32 (14)	14 (19)	18 (11)	32 (16)	0
	İpekyolu	24 (10)	4 (5)	20 (13)	15 (7)	9 (30)
	Tuşba	64 (28)	26 (36)	38 (24)	52 (26)	12 (40)
	Edremit	64 (27)	14 (19)	50 (31)	59 (29)	5 (17)
	TOPLAM	232	73	159	202	30

Tablo 4. Fekal koliform parametresinin ilçelere göre analiz sonuçları.

	Su örneğinin alındığı yer	Alınan örnek sayısı n (%)	Üreme görülmeyen örnek sayısı n (%)	Üreme görülen örnek sayısı n (%)	İyi kalite örnek sayısı n (%)	Kötü kalite örnek sayısı n (%)
İlçe	Muradiye	16 (7)	13 (7)	3 (7)	15 (7)	1 (10)
	Erciş	32 (14)	24 (13)	8 (18)	26 (12)	6 (60)
	Gevaş	32 (14)	27 (14)	5 (11)	32 (14)	0
	İpekyolu	24 (10)	17 (9)	7 (15)	21 (9)	3 (30)
	Tuşba	64 (28)	54 (29)	10 (22)	64 (29)	0
	Edremit	64 (27)	52 (28)	12 (27)	64 (29)	0
	TOPLAM	232	187	45	222	10

Tablo 5. Toplam koliform parametresinin ilçelere göre analiz sonuçları.

	Su örneğinin alındığı yer	Alınan örnek sayısı n (%)	Üreme görülmeyen örnek sayısı n (%)	Üreme görülen örnek sayısı n (%)	İyi kalite örnek sayısı n (%)	Kötü kalite örnek sayısı n (%)
İlçe	Muradiye	16 (7)	13 (8)	3 (5)	16 (7)	0
	Erciş	32 (14)	23 (13)	9 (15)	30 (13)	2 (25)
	Gevaş	32 (14)	24 (14)	8 (13)	32 (14)	0
	İpekyolu	24 (10)	17 (10)	7 (12)	20 (9)	4 (50)
	Tuşba	64 (28)	45 (26)	19 (32)	64 (29)	0
	Edremit	64 (27)	50 (29)	14 (23)	62 (28)	2 (25)
	TOPLAM	232	172	60	224	8

Van ve Erçek Gölü'ndeki 29 noktadan alınan 232 adet su örneğinin 8 haftalık süreyle incelenerek fekal koliform, toplam koliform ve enterokok yönünden kötü kalite su saptanan hafta sayısı ve yüzdesi Tablo 2'de verilmiştir. Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği'ne göre kötü kalite su belirlenen hafta sayısı ve yüzdeliği bakımından Fidanlık, Kampüs ve MTA sahillerinin yüzülebilir olmadığı, İskele, Doğan Kamping, DSİ kampı ve Yeniköy, Gölağzı, Karataşlar sahillerinin 2015 yılı Mayıs-Eylül arası dönemde fekal koliform, toplam koliform ve enterokok yönünden risk taşıdığı söylenebilir. Yalnızca bir hafta kötü kalite bulunan yerler ise takip edilmelidir.

Mikrobiyolojik kalitesi belirlenmek üzere incelemelere tabi tutulan toplamda alınan 232 adet örnekten; Erciş ilçesinde 4 adet, İpekyolu ilçesinde 9 adet, Tuşba ilçesinde 12 adet, Edremit ilçesinde ise 5 adet olmak üzere toplamda 30 adet örnek kötü kalite (yüzmeye uygun olmayan) olarak belirlendi.

Elde edilen örneklerin fekal koliform sonuçları dikkate alındığında; 232 adet örnekten; Muradiye ilçesinde 1 adet, Erciş ilçesinde 6 adet, İpekyolu ilçesinde ise 3 adet olmak üzere toplamda 10 adet örnek kötü kalite (yüzmeye uygun olmayan) olarak belirlendi.

Tablo 6. Yirmi dokuz noktadan iki hafta araliklarla 8 kez alınan 232 adet su örneğinin enterokok, fekal koliform ve total koliform sonuçları (kob/100ml).

	1			2			3			4			5			6			7			8				
	EN	FK	TK	EN	FK	TK	EN	FK	TK	EN	FK	TK	EN	FK	TK	EN	FK	TK	EN	FK	TK	EN	FK	TK		
(1)	20			30						2						1					1000			1800	10	
(2)				10					90	56						3					2000			2000		
(3)	7500			10						56						2					7			2000		
(4)	700			30			6400	2200	10700	4000											800	700	10000	10		
(5)	800	30,0	30,0	1100			10000	6500	14900	6400						1100					1050	250	300	1000	2000	10000
(6)					10	10					100										70		50	170		
(7)				20						3											25	30	30	160		
(8)				150	20	150	12			700	6000					10					950	15	70	120		
(9)				290			15									4					15	150	150	300		
(10)				30												25					8000	2200	2200	760		
(11)	30			10			230	80	380							20					8500	2000	2000	700	2000	10000
(12)	20			10			30									320					8500	2200	2200	560	30	
(13)				20			350	150	380	10						900					9000	2100	2100	670	2000	10000
(14)	60						7									3					6			200	10000	
(15)	90						7000			7						1					1700	250	1500	60		
(16)	30			80	150	150	7			30											3			30		
(17)										40											1800	800	1000	30		
(18)				40	10	10				40						1					8	10	15	30		
(19)	30			30						9						2					5	50	70	60		
(20)				30			15									3					8	7	10	900	10000	
(21)	200	180,0	400,0	100	80	80	2400	1200	6200	20	100	270	17			5					1600	70	1400	40		
(22)	240									70						3						5	15	20	260	
(23)										92						13					2	70	100	30	400	
(24)	40									90	20	55									2500	300	3000	90	40	
(25)	300									96						2					3	70	80	70	120	
(26)										88						1					2	10	20	30	400	
(27)	7500	140,0	340,0	1150			1400			1400		1000	4500			6					200	400	1800		850	
(28)	8000	800,0	1800,0	1120			4300			4300			6500			25					2300	200	2000		700	
(29)	1100						76														2			20	650	

EN: Enterokok; FK: Fekal koliform; TK: Toplam koliform
 İstasyonlar: (1) Ünseli; (2) Ünseli belediye karşısı; (3) Erçek; (4) İskele; (5) Fidanlık; (6) Akdamar adası karşısı; (7) Grand Deniz; (8) DSİ ve Kızılay Kampı; (9) Akdamar İşçiri; (10) Çelebiada; (11) Karataşlar; (12) Balıkbendi; (13) Gölağzı; (14) Su sporları merkezi; (15) DSİ KAMPİ ve YENİKÖY; (16) Karayolları ve kaymakamlık plajı; (17) Engil Çayı; (18) Şahintepesi; (19) Polis Kampı; (20) Vahi Konagi; (21) Doğan Kamping; (22) Yeşilsu köyü; (23) Çolpan yazlıkları; (24) Çitören köyü; (25) Çakırbey köyü; (26) Ağartı köyü; (27) Kampüsü; (28) MTA; (29) Malakası yazlıkları

Alınan su örneklerinin toplam koliform bakteriler açısından değerlendirilmesi sonucu ise; 232 adet örnekten; Erciş ilçesinde 2 adet, İpekyolu ilçesinde 4 adet, Edremit ilçesinde ise 2 adet olmak üzere toplamda 8 adet örnek kötü kalite (yüzmeye uygun olmayan) olarak belirlendi.

Van ve Erçek Gölü'ndeki 29 noktadan alınan 232 adet su örneğinin 8 haftalık süreyle incelenerek fekal koliform, enterokok ve toplam koliform yönünden sonuçları da Tablo 6'da gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Patojen mikroorganizmalar kısa süre içinde ürer ve yaşarlar. Bu kısa süre içinde bu kontamine su ile temas edenleri ağız, burun, deri yoluyla doğrudan, deniz ürünleri ile de dolaylı yoldan etkiledikleri; kolera, tifo, paratifo, çocuk felci, sarılık gibi pek çok hastalıklara yol açabildikleri belirtilmiştir⁽¹³⁾. Günümüzde sahil bölgelerindeki nüfus artışı önemli sorundur. Hızlı nüfus artışı, plansız şehirleşme ve altyapı yetersizlikleri gibi nedenlere bağlı olarak özellikle deniz suyu ve kumsallarda kirliliğin arttığı belirtilmektedir⁽¹⁴⁾. Dünya Sağlık Örgütü ve Medline veritabanından derlenen bir makalede, rekreasyonel amaçlı kullanılan sularda bakteri sayılarındaki artış ile kullananların sağlık riski arasında anlamlı bir ilişki olduğu ortaya konmuştur⁽¹⁵⁾. Yüzme sularındaki fekal kirlenme halk sağlığı açısından büyük bir risk taşımakta ve yapılan çalışmalar, fekal indikatör varlığı ile hastalık oluşması arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir⁽¹⁶⁾.

Ülkemizin çeşitli bölgelerinde göl ve deniz kıyısı su örneklerinin mikrobiyolojik kaliteleri üzerine yapılmış çok sayıda araştırma vardır. Manyas Gölü'nde yapılmış bir çalışmada, Enterobacteriaceae miktarını 1-3.5 log arasında bildirilmiştir⁽¹⁷⁾. Bizim çalışmamızda ise, alınan 232 örnekten 159 örnekte enterokok, 45 örnekte fekal koliform, 60 örnekte ise toplam koliform bakterisine rastlanmıştır. Başka bir çalışmada, 37 adet göl suyu örneğinin %73'ünde fekal kontaminasyon olduğunu saptamıştır⁽¹⁸⁾. Çalışmamızda, fekal kontaminasyon oranı %16 olarak saptanmıştır. Dicle Nehri'nde yapılan bir çalışmada, bulunan toplam mezofilik aerob bakteri ($3.97-5.30 \log_{10}$ kob/ml)

ile koliform bakteri sayıları ($2.10-4.02 \log_{10}$ kob/ml) karşılaştırıldığında, nehir kirli su olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, incelenen su örneklerinin hepsinde koliform (%100) ve 27'sinde ise (%90) ise *E. coli* varlığı saptanmıştır⁽¹⁹⁾. Çalışmamızda, alınan 232 örnekte 159 (%69) enterokok, 45 (%19) fekal koliform, 60 (%26) toplam koliform bakterisine rastlanmıştır. Diler ve ark.⁽²⁰⁾, Kovada Kanalı'nda 7 noktada yaptıkları bir çalışmada, bütün istasyonlarda enterokok ve koliform bakterisine fazla miktarlarda saptandığını bildirmişlerdir. Bizim 29 noktada yaptığımız çalışmada ise, dört istasyonda enterokok ve koliform bakteri üremesinin fazla miktarlarda olduğu görülmüştür. Alkan ve ark.⁽²¹⁾, Uluabat Gölü'nün doğusunda yaptıkları çalışmada, toplam koliform sayısını ortalama 16.700/100 ml olarak belirlemişler ve toplam koliform açısından "4. Sınıf" (çok kirli su) olduğunu, gölün rekreasyon, sulama suyu, hayvan üretimi, içme suyu temini, balık üretimi gibi amaçlar için kullanımının sakıncalı olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, toplam koliform sayısı ortalama 2200/100 ml olarak saptanmıştır. Ulubat Gölü'nde yapılan diğer bir çalışmada ise, gölün toplam koliform açısından yaz aylarında daha yüksek olduğu bildirilmiştir⁽²²⁾. Tabak ve ark.'nın⁽²³⁾ Rize sahil noktalarında fekal kirlenme ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, alınan örneklerin %56'sının 1100 EMS/100 ml değerini aştığını bildirilmiştir. Çalışmamızda, örneklerin 36 (%16)'sı fekal streptokok, fekal koliform veya toplam koliform parametrelerinden en az birinin zorunlu değeri aştığı gözlemlenmiştir. Akkurt ve Özdemir⁽²⁴⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, Rize kıyı şeridinde numune alınan istasyonlarda fekal ve toplam koliform açısından sınır değerlerinden fazla olduğunu ve insan sağlığı açısından zararlı seviyelerde olduğu dönemler belirlenmiştir. Çalışmamızda, 7 ve 8. haftalarda tüm istasyonlarda yoğun üreme olduğu görülmüştür (Tablo 6). Altuğ ve ark.⁽²⁵⁾ Sapanca Gölü yüzey sularında yaptıkları araştırmada, koliform bakteri sayısını 2400 MPN/100 mL olarak belirlemişlerdir. Antalya'da Konyaaltı ve Lara plajlarında deniz suyu örneklerinde sırasıyla intestinal enterokok %22, %30 ve *E. coli* %14, %6 oranlarında olup, kılavuz değerlerinden fazla ürediğini görmüşlerdir⁽²⁶⁾. Çalışmamızda enterokok yönünden 30'u (%12.9), fekal koliform yönünden 10'u (%2.3), toplam koliform yönünden ise 8'i (%3.4)

kötü kalite (yüzmeye uygun olmayan) olarak belirlendi. Senegal Nehri'nde yapılan bir çalışmada, toplam bakteri sayısının 2.7×10^6 ile 8.1×10^7 olduğu, fekal kontaminasyonun belirli bölgelerde belirlendiği bildirilmiştir⁽²⁷⁾. Bizim çalışmada da toplam koliform bakteri sayısı 10 ile 10700 arasında olduğu ve belli bölgelerde (Fidanlık, Kampüs, MTA ve iskele sahilleri) yoğun fekal kontaminasyon görülmüştür. Gaga Gölü'nde yapılan bir çalışmada, fekal streptokok ve fekal koliform değerlerinin sonbahar yağışlarının olduğu Eylül ve Ekim ayında çok artış gösterdiğini gözlemlenmiştir⁽²⁸⁾. Bizim çalışmamızda da Eylül ayında yapılan iki çalışmada da fekal koliform, fekal streptokok ve toplam koliform değerlerinin arttığı görülmüştür. Taşınar ve ark.'nın⁽²⁹⁾ 2015 yılında, Rize ili kıyı şeridinde yaptıkları bir çalışmada, dört farklı istasyondan mevsimsel olarak alınan su örnekleri üzerinde araştırması sonuçları değerlendirildiğinde, sonbahar mevsiminde iki istasyonda kirlilik belirlenmiş olup, toplam koliform açısından sınır değerlerin aşıldığı görülmüştür. Yaz mevsiminde hiçbir istasyonda fekal ve toplam koliform sınır değerlerinin aşılmadığı saptanmıştır. Çiçek ve ark.'nın⁽³⁰⁾ 2017'de, Eskişehir ilinin bazı sulama göletlerinin su kalitesini değerlendirmek için yaptıkları bir çalışmada yaz ve sonbahar aylarında suyun III. sınıf kalite olduğunu, başka bir deyişle, suyun kalitesinin kirliliği olduğunu belirlenmiştir. Çelebi⁽³¹⁾ 2018 yılında, Aksaray ilindeki Karasu sulama kanalının mikrobiyolojik kalitesini mevsimsel olarak Temmuz, Nisan, Eylül ve Şubat aylarında incelenmiş ve toplam koliformu 92-302/100 kob/ml, fekal koliformu 16-225/100 kob/ml, fekal streptokokları 2-26/100 kob/ml olarak saptamış ve II. sınıf su kalitesinde (az kirlenmiş su) olduğunu bildirmiştir⁽³¹⁾. Yalın ve ark.'nın⁽³²⁾ Burdur Karacaören I Baraj Gölü'nde yaptığı çalışmada, koliform ve fekal koliform bakteri yoğunluklarının mevsimsel değişimleri izlenmiş ve toplam koliform bakteri sayısı 500 - >100.000 kob/100 ml, fekal koliform bakteri sayısı 430 - 14680 kob/100 ml arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bu gölü besleyen Isparta ve Göksu Deresi toplam koliform ve fekal koliform bakteri sayıları, tüm aylarda, oldukça yüksek değerlerde kaydedilmiş, III. ve IV. sınıf su kalitesinde olduğu saptanmıştır⁽³²⁾.

Bu çalışmada, Van ve Erçek Gölü'nün belirlenen 29 noktasından alınan su örneklerinin enterokok, fekal koliform ve toplam koliform yönünden risk altında olup olmadığı araştırılmıştır. Alınan 232 su örneğinin 196'sında (%84) bakteriyel kirlilik bulunmazken, 36 örneğin (%16) kontaminasyon olduğu belirlendi. Bu verilerimize göre, Van Gölü sahillerinin büyük bir kısmının yüzmeye uygun olduğu saptanmıştır. Parametre bazında ele alındığında, toplamda alınan 232 adet örneğin enterokok yönünden 30'u (%12.9), fekal koliform yönünden 10'u (%2.3), toplam koliform yönünden ise 8 i (%3.4) kötü kalite (yüzmeye uygun olmayan) olarak belirlendi. Bu kirliliğin nedenleri, atık su arıtma tesisinin tam kapasite çalışmadığı, Van Gölü'ne dökülen dere, çay ve kanalların yerleşim alanlarından aldıkları katı ve sıvı atıkları doğrudan göle taşıdıkları, kamu kurumlarına ait işletmeler, yazlıklar ve özel tesislerin genel olarak arıtma tesisi kurmadan sıvı atıklarını fosseptik çukurlarında biriktirdikleri, zamanında boşaltılmayan bu çukurların taşma sonucu göle sızdığı, katı atıkların gelişi güzel depolandığı, kâğıt, poşet gibi uçucu çöplerin rüzgârın etkisiyle göle ulaştığı, piknik ve yüzmeye alanlarında çöp toplama konteynirleri ve lavabolarının olmadığı, bu alanlarda bulunan çeşmelerde yıkanan bulaşıklardan çıkan sıvı atıkların ve deterjanların göle akıtıldığı, havza boyunca yer alan yerleşim alanlarında kanalizasyon sistemi olmadığından tuvalet atıklarının fosseptik çukurlarıyla bertaraf edildiği, ancak mutfak sularının fosseptiklere verilmediği ve göle deşarj edildiği, yaz aylarında söz konusu fosseptiklerde taşma sonucu gölü kirlettiği düşünülmektedir.

Genel olarak çok kirliliği olmayan ancak kötü kalite su olarak belirlenen sahillere sahip Van Gölü'nün çevresine yapılacak yatırımların gölü kirletmeyecek niteliklere sahip olması bu gölün balıkçılık ve rekreasyon için kullanımını sağlayacaktır. Çünkü kontamine suyu temizlemek, temiz olan suyu korumak ve kullanmak daha önemlidir ilkesiyle gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Van merkezde faaliyette olan arıtma tesisinin kapasitesi yetersiz olduğundan kentin kapasitesini karşılayacak şekilde yeni bir arıtma tesisinin inşa edilmesi, hem yerleşim alanlarından hem de sahile yakın işletmelerden çıkan atık suların teknolojiye uygun arıtma yöntemleriyle arıtıldıktan sonra

göle deşarj edilmesi, Van Gölü'ne akan tüm dere, çay ve kanalların ıslah çalışmalarının yapılması ve arıtıldıktan sonra göle deşarj edilmesi, havzaya sınır tüm yerleşim alanlarında kanalizasyon ve uygun arıtma tesislerinin kurulması, bütün yüzme alanlarının katı ve sıvı atıklarının uygun biçimde giderilmesi, temizlik personeli görevlendirilmesi, duş lavabo yapılması ve sahil, piknik alanlarının kullanımı hususunda halka eğitici faaliyetlerin düzenlenmesi ve uyarı tabelaların konulması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, Van ili ve Van Gölü havzasına sınır diğer illerin, Van Gölü'nün turistik anlamda gelişebilmesi ekonomik, kültürel ve sosyal gelişimi de beraberinde getirecektir. Bu nedenle tüm havzayı ele alarak havza sınırlarında yer alan tüm belediye başkanlıkları, kamu kurum kuruluşları ve özel sektörü de kapsayacak şekilde bir konseptle birlikte geliştirilecek projelerle Van Gölü, halk sağlığı açısından güvenilir kılınabilir ve kent önemli bir turizm merkezi hâline getirilebilir.

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

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

KAYNAKLAR

1. Verep B, Serdar O, Turan D, Şahin C. İyidere (Trabzon)'nin fiziko-kimyasal açıdan su kalitesinin belirlenmesi. *Ekoloji*. 2005;14(57):26-35.
2. Halkman A. Koliform grup bakterilerin aranması ve sayılması, koliform grup-fekal koliformlar- *E. coli* ilişkisi. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No. 97-11-12-01, Ankara Üniversitesi Gıda Müh. Böl. Gıda Bilimleri Anabilim Dalı, Ankara; 1999.
3. Özkanca R. Akuatik Mikrobiyoloji. Sürat Üniversite Yayınları. Gaziemir, İzmir;2014.
4. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojide Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, Güncelleştirilmiş 2.baskı, 1995:768.
5. Uslu O, Türkman A. Su Kirliliği ve Kontrolü, T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları, İzmir; 1987.
6. Bilgili A, Sagmanlıgil H. Van Gölü suyunun doğal kalitesi ve buradan avlanan inci kefalı (*Chalcalburnus tarichi*) örneklerinde bazı ağır metal düzeyleri. Ankara Ü Vet Fak Derg. 1995;42(4):445-50.
7. Tekbaş F, Oğur R. Temel su analiz teknikleri, 2005:35-36.
8. Resmî Gazete. Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği (76/160/AB). Tarih ve sayı:09.01.2006/26048. T.C. Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ankara, 2006.
9. TS EN ISO 9308-1 Su kalitesi -*Escherichia coli* ve koliform bakterilerin tespiti ve sayımı-Bölüm 1: Membranla süzme yöntemi. Türk Standartları Enstitüsü. 2004.
10. Halkman AK. Mikroorganizma analiz yöntemleri. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara. 2005:89-124.
11. TS EN ISO 9308-1 Su kalitesi -*Escherichia coli* ve koliform bakterilerin sayımı - Bölüm 1: Düşük bakterili zemin floralı sular için membranla süzme yöntemi. Türk Standartları Enstitüsü. 2000.
12. TS EN ISO 7899-2 Su kalitesi-Bağırsak enterokoklarının tespiti ve sayımı-Bölüm 2: Membran süzme yöntemi. Türk Standartları Enstitüsü. 2002.
13. Evanson M, Ambrose RF. Sources and growth dynamics of fecal indicator bacteria in a coastal wetland system and potential impacts to adjacent waters. *Wat Res*. 2006;40(3):475-86.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.027>
14. WHO. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: Coastal and fresh waters. World Health Organisation, Geneva; 2003.
15. Pruss A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *Int J Epidemiol*. 1998;27(1):1-9.
<https://doi.org/10.1093/ije/27.1.1>
16. Godfree A, Jones F, Kay D. Recreational water quality: the management of environmental health risks associated with sewage discharges. *Mar Pollut Bull*. 1990;21(9):414-22.
[https://doi.org/10.1016/0025-326X\(90\)90760-6](https://doi.org/10.1016/0025-326X(90)90760-6)
17. Karafistan A, Çolakoğlu FA. Physical, chemical and microbiological water quality of the Manyas Lake, Turkey. *Mitig Adapt Strat Glob Change*. 2005;10:127-43.
<https://doi.org/10.1007/s11027-005-7835-x>
18. Patır B, Güven AM, Arslan A. Elâzığ Bölgesi içme ve kullanma, kaynak, kuyu ve göl sularının hijyenik kaliteleri üzerine araştırmalar. *Fırat Ü Sağ Bil Derg*. 1992;6(1,2):127-34.
19. Erkan ME, Vural A. Dicle nehrinin hijyenik kalitesi üzerine bir araştırma. *Dicle Tıp Derg*. 2006;33(4): 205-9.
20. Diler Ö, Işıklı B I, Altun S, Aybal NÖ. Eğirdir Gölü Kovada kanalının bakteriyolojik su kalitesi üzerine bir araştırma. *Eğirdir Su Ürünleri Fak Derg*. 1999;6:207-19.
21. Alkan U, Çalışkan S, Mescioğlu Ü. Uluabat Gölü'nün

- mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi. *Ekoloji*. 1999;33:3-5.
22. Elmaci A, Topac FO, Ozengin N, Teksoy A, Kurtoglu S, Baskaya HS. Evaluation of physical, chemical and microbiological properties of Lake Uluabat Turkey. *J Environ Biol*. 2008;29(2):205-10.
 23. Tabak F. Rize sahillerinde fekal kirlenmenin boyutları ve özellikleri. [Yüksek Lisans Tezi] Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı, 2002.
 24. Akkurt S, Özdemir M. Deniz sularındaki toplam ve fekal koliform bakteri sayıları [Bitirme Çalışması] Rize: RTEÜ Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği, 2007; 30.
 25. Altuğ G, Yardımcı CH, Okgerman H, Tarkan SA. Sapanca gölü yüzey sularında bakteriyel metabolik aktivite, indikatör (*Koliform*, *Escherichia coli*) ve patojen bakteri (*Salmonella* spp.) düzeyleri. *J Black Sea/Medit Environ*. 2006;12(1):67-77.
 26. Topaloğlu A. Antalya kıyılarında rekreasyon amacıyla kullanılan plajların kum ve deniz suyunun mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. [Yüksek Lisans Tezi] Antalya: Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
 27. Troussellier M, Got P, Bouvy M, et al. Water quality and healthy status of Senegal River estuary. *Mar Pollut Bull*. 2004;48(9-10):852-62.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.10.028>
 28. Koloren Z, Taş B, Kaya D. Gaga Gölü (Ordu, Türkiye)'nün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bil Derg*. 2011;2(1):74-85.
 29. Taşpınar B, Verep B, Terzi E, Çetindemir D. Rize ili kıyı şeridinde bakteriyolojik kirliliğin araştırılması. *Aquaculture Studies*. 2015;15(2):17-27.
<http://doi.org/10.17693/yunusae.vi.235762>
 30. Çiçek A, Uysal E, Köse E, Tokatlı C. Eskişehir'de yer alan bazı sulama göletlerinin su kalitesinin değerlendirilmesi. *Nevşehir Bil Teknol Derg*. 2017;6(Özel Sayı):440-6.
<https://doi.org/10.17100/nevbittek.319890>
 31. Çelebi H. Karasu kanal sularında belirli mikroorganizma türlerinin araştırılması. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*. 2018;6(2):182-9.
<https://doi.org/10.21923/jesd.398688>
 32. Yalın FB, Emre N, Güllü İ ve ark. Karacaören I baraj gölü (Burdur) mikrobiyolojik kirlilik düzeyinin mevsimsel değişimi. *LimnoFish*. 2020;6(2):120-6.

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Vankomisine Direçli Enterokok (VRE) Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Değerlendirilmesi

Phenotypic and Genotypic Evaluation of Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) Strains Isolated from Various Clinical Specimens

Semra Bilen*[©], Mehmet Parlak*[©], Yusuf Yakupoğulları**[©], Hüseyin Güdücüoğlu*[©], Yasemin Bayram*[©]
Cennet Rağbetli***[©], Arzu Uyanık Parlak****[©], Şevin İrden*[©]

*Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

**İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

***SBÜ Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van, Türkiye

****Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Atf/Cite as: Bilen S, Parlak M, Yakupoğulları Y, Güdücüoğlu H, Bayram Y, Rağbetli C, Uyanık Parlak A, İrden Ş. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen vankomisine direçli enterokok (VRE) suşlarının fenotipik ve genotipik değerlendirilmesi, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):143-9.

Öz

Amaç: Enterokoklar, birçok antibiyotiğe doğal dirençli olmaları, özellikle glikopeptidlere (vankomisin, teikoplanin) karşı oluşturdukları kazanılmış direnç mekanizmaları nedeniyle dünya genelinde önemli mikroorganizma grubu içerisinde yer alır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden elde edilen Vankomisine dirençli Enterokok suşlarında fenotipik olarak vankomisin ile teikoplanin direnci belirlenmiş ve moleküler yöntemlerle VanA, VanB ve VanC varlığı araştırılmıştır.

Yöntem: 2015-2018 yılları arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 30 adet Vankomisine dirençli Enterococcus ssp. suşu çalışmaya dâhil edilmiştir. Suşların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi için MicroScan WalkAway 96 Plus (Beckman Coulter, ABD) otomatize sistem kullanılmıştır. Vankomisin ve teikoplanin direnci ayrıca gradient test yöntemi ile çalışılmıştır. Direnç genleri, uygun primerler kullanılarak in-house PCR yöntemi ile araştırılmıştır. PCR testleri İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Bulgular: İdentifikasyon testleri sonucunda suşların 29'u Enterococcus faecium, bir tanesi Enterococcus faecalis olarak tanımlanmıştır. Otomatize identifikasyon sistemi ile suşların tümü vankomisin ve teikoplanine karşı dirençli bulunurken gradient test yöntemi izolatların üç tanesi her iki antibiyotiğe de duyarlı olarak bulunmuştur. Bu üç suşta VanA, VanB ve VanC genlerinin hiçbirisine rastlanmamıştır. Moleküler yöntemle 27 suşta VanA, bir suşta VanB geni saptanırken, hiçbir suşta VanC genine rastlanmamıştır. Enterokok izolatlarında glikopeptid direncinin belirlenmesinde gradient test yöntemi ile moleküler yöntemin %100 uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç: Gradient test yöntemi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında enterokok izolatlarının glikopeptid direncini saptamada güvenilir sonuç vermektedir.

Anahtar kelimeler: Vankomisine dirençli Enterokok, Gradient test, VanA, VanB, VanC

ABSTRACT

Objective: Enterococci are among the important microorganism group worldwide due to their natural resistance to many antibiotics, especially their acquired resistance mechanisms against glycopeptides (vancomycin, teicoplanin). In this study, vancomycin and teicoplanin resistance were phenotypically determined in Vancomycin-resistant Enterococci strains obtained from various clinical specimens, and the presence of VanA, VanB and VanC was investigated by molecular methods.

Method: A total of 30 VRE strains isolated from various clinical specimens at Microbiology Laboratory of Van Yuzuncu Yil University Faculty of Medicine Hospital between 2015 and 2018 were included in the study. MicroScan WalkAway 96 Plus (Beckman Coulter, USA) automated system was used for the identification of strains and determination of antibiotic resistance. Antimicrobial resistance to vancomycin and teicoplanin were also determined by gradient test method. Resistance genes were investigated by in-house PCR method performed in Inonu University Faculty of Medicine, Molecular Diagnostics Laboratory of The Department of Medical Microbiology using appropriate primers.

Results: Identification tests revealed 29 strains as Enterococcus faecium and 1 as Enterococcus faecalis. While all strains were resistant to vancomycin and teicoplanin in the automated identification system, three isolates tested by gradient test method were found to be susceptible to these antibiotics. Molecular method of these three strains showed that there were no VanA, VanB and VanC genes. While VanA gene was detected in 27 strains, VanB gene was detected in one strain, and VanC gene was not detected. Resistance detection by gradient test and molecular method were found to be 100% compatible in the identification of vancomycin-resistance in enterococci isolates.

Conclusion: Gradient test method is reliable in determining glycopeptide resistance of enterococcal isolates in clinical microbiology laboratory.

Keywords: Vancomycin resistant Enterococci, Gradient test, VanA, VanB, VanC

Alındığı tarih / Received:
14.11.2020 / 14.November.2020

Kabul tarihi / Accepted:
09.01.2021 / 09.January.2021

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

S. Bilen 0000-0003-1322-5017
M. Parlak 0000-0001-6030-2244
Y. Yakupoğulları 0000-0002-5545-3467
H. Güdücüoğlu 0000-0003-1101-9017
Y. Bayram 0000-0001-6083-5550
C. Rağbetli 0000-0001-5876-5215
A. Uyanık Parlak 0000-0001-7137-7356
Ş. İrden 0000-0002-8387-1738

✉ mehmetparlak65@hotmail.com

GİRİŞ

Enterokoklar, insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminin flora elemanı olarak bulunmakla beraber, doğada (toprak, su, yiyecek vb.) çok yaygın olarak bulunmaktadır. Bununla birlikte, bakteriyemi, endokardit, yara enfeksiyonları, safra kesesi enfeksiyonları, menenjit, nozokomiyal pnömoni ve çoğunlukla üriner sistemi enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıklara neden olabilirler⁽¹⁾. Enfeksiyon etkeni olarak %80-90 oranında birinci sırada *Enterococcus faecalis* sorumlu tutulurken, ikincil en sık etken ise %5-15 oranında *Enterococcus faecium*'dur⁽²⁾. Enterokoklar nadiren endokardite neden olurken, nozokomiyal enfeksiyonların en sık etkenleri arasında ikinci veya üçüncü sırada yer alırlar⁽³⁾.

Enterokokların hastane enfeksiyonu olarak bilinmesinin ve hastane enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir sorun olmasının nedeni son zamanlarda birden fazla antibiyotige direnç gösteren enterokokal enfeksiyonların sayıca artmasıdır⁽⁴⁾. Özellikle glikopeptidlere karşı kazandıkları direnç mekanizmaları nedeniyle (VRE) enterokoklar, dünya genelinde önemi artan mikroorganizma grubu içerisinde yerini almıştır⁽⁵⁾. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve uzun süreli hastane yatışı VRE kolonizasyon riskini arttıran faktörlerden bazılarıdır⁽⁶⁾.

VRE ilk olarak 1988 yılında İngiltere'den ve sonrasında da Fransa'dan bildirilmiştir^(7,8). Ülkemizde ilk VRE izolatu 1998 yılında Akdeniz Üniversite'sinden bildirilmiş olup, ardından birçok merkezden bildirim yapılmaya başlanmıştır⁽⁹⁾. VRE enfeksiyonlarının yatan hastalarda yayılmasının önlenmesi için kolonize hastaların saptanması ve bu hastaların izole edilmeleri gerekmektedir⁽¹⁰⁾. VRE ile enfeksiyon sıklığı düşük olmasına rağmen, mortalitesi daha yüksektir⁽¹¹⁾. Bu nedenle enterokoklarda glikopeptit grubu antibiyotik direncinin saptanması, tarama yöntemleri ve alınacak önlemler büyük önem taşımaktadır.

Çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen Vankomisine dirençli olduğu belirlenen 30 adet enterokok suşunda fenotipik ve genotipik yöntemlerle *VanA*, *VanB* ve *VanC* varlığı araştırılmıştır.

pik yöntemlerle *VanA*, *VanB* ve *VanC* varlığı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta Örneklerinden VRE Suşlarının İzole Edilmesi: 2015-2018 yılları arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen vankomisine dirençli olduğu belirlenen 30 adet enterokok (VRE) suşu çalışmaya dâhil edildi.

Çalışmada kullanılan izolatlar gradient testleri ve moleküler testler çalışılincaya kadar %20 gliserollü buyyonda -80°C'de saklandı. Laboratuvara gönderilen örnekler %5 koyun kanlı agar ekimi yapıldıktan sonra 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üreme saptanan ve uygun koloni morfolojisine sahip, Gram pozitif, pyrolidonyl arylamidaz (PYR) testi pozitif, katalaz testi negatif koklar enterokok olarak tanımlandı.

Suşların tür düzeyinde identifikasyonu ile antibiyotik duyarlılık testlerinin belirlenmesi, üretici firmanın önerileri doğrultusunda MicroScan WalkAway 96 Plus (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi. Ayrıca izolatlar İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Matris Aracılı Lazer Desorbsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) temelli bir sistem olan VITEK MS (BioMerieux, Fransa) (database v2.0) ile tanımlandı.

Gradient test ile Vankomisin ve Teikoplanin direncinin saptanması: Çalışma zamanına kadar %20 gliserollü buyyonda -80°C'de saklanan VRE izolatları iki kez pasajlandıktan sonra gradient test yöntemi ile fenotipik olarak vankomisin ve teikoplanin direnci araştırıldı. Bu amaçla bakteriden 0.5 McFarland bulaıklığında hazırlanan süspansiyonlar Müeller-Hinton agar besiyeri yüzeyine steril eküvyon çubuğu yardımıyla sürüntü ekimi yapıldı. Daha sonra vankomisin ve teikoplanin gradient test stripleri yerleştirilerek plaklar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda üremenin görülmediği hattın gradient testi üzerindeki MİK değeri ile keşiştiği nokta kaydedildi.

Moleküler Yöntemle Direnç Genlerinin Tespiti: DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemiyle uygulanmıştır. Koyun kanlı agar plaklarında üreyen bakterilerden eküvyon çubuğu yardımı ile toplanarak 1 ml steril serum fizyolojik içerisinde 1-2 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Mikrosantrifüj tüplerine alınan bu süspansiyon 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilerek pellet 100 µl TE tamponu ile resüspanse edilmiştir. Isı bloğunda 100°C'de 5 dakika kaynatılarak -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

PCR karışımı, primerleri, 2X Master Mix ve H₂O içeriyordu. 0.2 ml PCR tüpünde hazırlanarak PCR cihazına yerleştirildi. Her amplifikasyon örneği için 2X Master Mix ve primer karışımına 5 µl kalıp DNA eklenerek amplifikasyon döngüleri uygulandı [94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyon adımı; 30 döngü amplifikasyon (45 saniye süreyle 95°C'de denatürasyon, 30 saniye süreyle 56°C'de bağlanma ve 2 dakika için 65°C'de uzatma) ve 65°C'de son uzatma 10 dakika]. PCR işleminden sonra örneklerden 10 µl alınarak agaroz jele yüklendi. Jel 150 voltta üç saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Daha sonra görüntüleme sistemine aktarılmıştır. Kullanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir.

İstatistik Yöntem: Oranlar arası fark için Z testi ile oran karşılaştırması yapılmıştır. Hesaplamalarda ista-

tistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için Minitab v14 (Köln, Almanya) istatistik paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya çeşitli kliniklerden gönderilen materyallerden izole edilen 30 enterokok suşu dâhil edildi. Gönderilen materyallerin dağılımı ise 15'i idrar, 9'u kan, 3'ü beyin omurilik sıvısı (BOS), 2'si kateter ve 1'i yara örneği şeklindedir. Enterokok izolatlarının MicroScan WalkAway 96 Plus (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak yapılan identifikasyon işlemi sonucu 29'u *E. faecium* ve bir adedi *E. faecalis* olarak belirlendi. VITEK MS sistemi ile de (BioMérieux, Fransa) suşlar aynı şekilde tanımlandı. Çalışılan enterokok suşlarının MicroScan WalkAway 96 Plus (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak yapılan vankomisin ve teikoplanine karşı duyarlılık test sonuçlarına göre tüm izolatlarda vankomisin ve teikoplaninin her ikisi için MİK değerleri >16 mg/L bulundu.

Vankomisin ve Teikoplanin için yapılan gradient testi sonuçlarına göre 3 suş için (9-11-20 numaralı suşlar) elde edilen MİK değerleri, EUCAST kriterlerine göre kıyaslandığında vankomisin ve teikoplanine karşı duyarlı olarak saptandı. Diğer suşların tamamı vankomisin ve teikoplanine dirençli belirlendi (MİK > 256). Vankomisin ve teikoplanin için elde edilen MİK değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Moleküler yöntemlerle yapılan direnç genlerinin belirlenmesinde 30 suşun 27'sinde *VanA*, 1'inde (23 No.lu suş) *VanB* geni saptandı. Hiçbir suşta *VanC* genine rastlanmadı. Direnç genlerinin jel görüntüleri Şekil 1 ve 2'de verilmiştir.

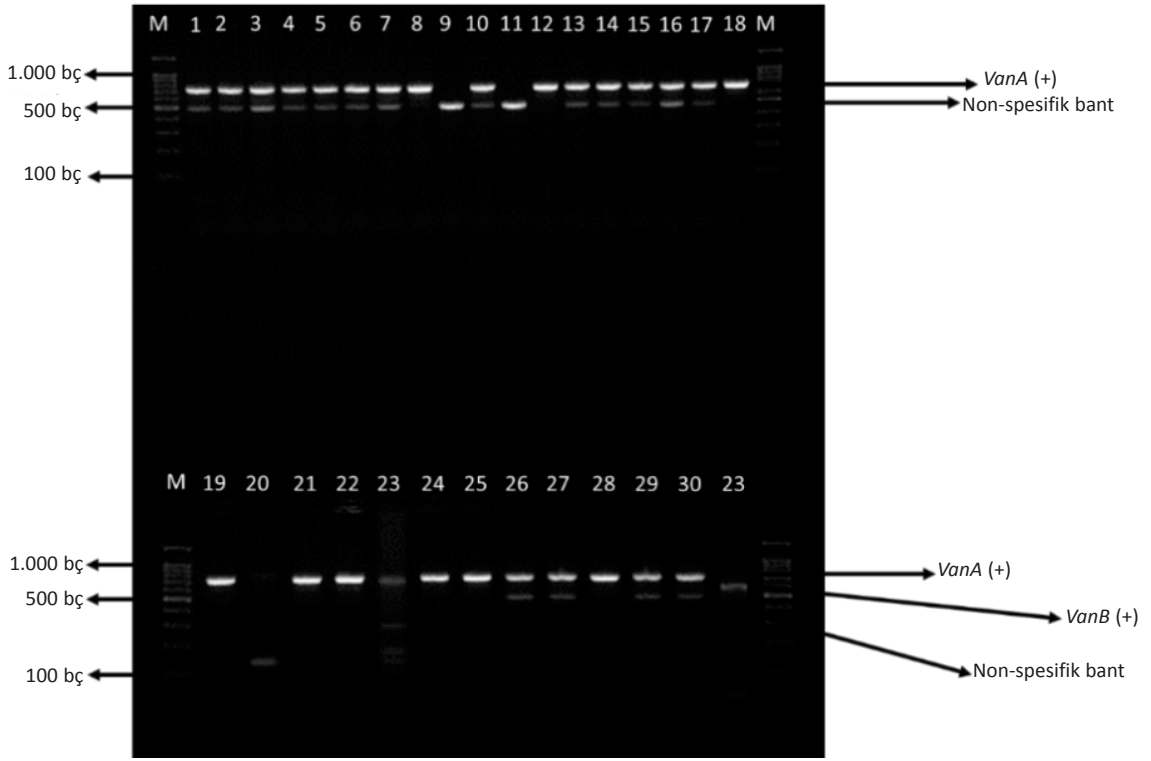
Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler.

Amplified gene	Sequence (5' - 3')
<i>Enterococcus faecalis</i>	F: ATCAAGTACAGTTAGTCT R: ACGATTCAAAGCTAACTG
<i>Enterococcus faecium</i>	F: TAGAGACATTGAATATGCC R: TCGAATGTGCTACAATC
<i>vanA</i>	F: GGGAAAACGACAATTGC R: GTACAATGCGGCCGTTA
<i>vanB</i>	F: ACGGAATGGGAAGCCGA R: TGCACCCGATTTCTGTC
<i>vanC</i>	F: ATGGATTGGTAYTKGTAT* R: TAGCGGGAGTGMCMGTAA*

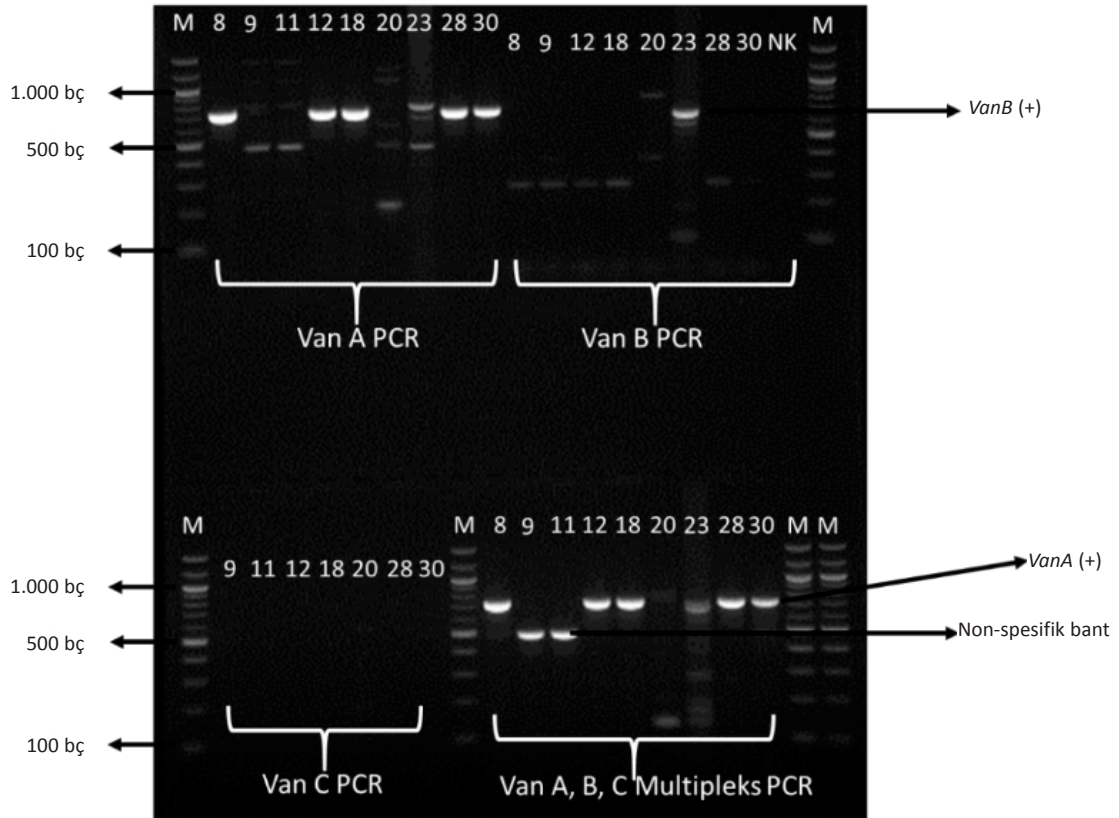
* K = G veya T; M = A veya C; Y = C veya T

Tablo 2. Vankomisin ve teikoplanin için gradient testi sonuçları.

Suş No	Suş Adı	Antibiyotikler	
		Vankomisin	Teikoplanin
9	<i>E. faecium</i>	0.5	0.25
11	<i>E. faecium</i>	0.5	0.25
20	<i>E. faecalis</i>	0.5	0.5
Diğer suşlar	<i>E. faecium</i>	>256	>256



Şekil 1. PCR yöntemi ile direnç genlerinin jel görüntüsü.



Şekil 2. PCR yöntemi ile direnç genlerinin jel görüntüsü.

Tablo 3. Yöntemlerin birbirleriyle karşılaştırılması.

Yöntem Adı	Dirençli (R)	Duyarlı (S)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Otomatize Sistem				
Vankomisin	30	0	100	0*
Teikoplanin	30	0	100	0*
Gradient Test				
Vankomisin	27	3	100	100
Teikoplanin	27	3	100	100
Moleküler Yöntem				
VanA				
VanB	27	3		
VanC				

*: Duyarlı suş sayısı az olduğu için değerlendirme yapılamadı.

Otomatize sistem ve moleküler yöntemle suşların identifikasyonu uyumlu olarak belirlendi. Her iki yöntemle de toplam 30 suşun 29'u *E. faecium*; bir adedi *E. faecalis* olarak izole edildi. Otomatize sistemle tüm suşlar vankomisin ve teikoplanine karşı dirençli bulundu. Gradient test yöntemi ile 3 adet suş vankomisin ve teikoplanine duyarlı olarak saptandı. Moleküler yöntemle de bu suşlarda *VanA*, *VanB* ve *VanC* direnç genlerinin hiçbirisine rastlanmadı. Buna göre moleküler yöntem standart olarak kabul edildiğinde otomatize sistemin ve gradient test yönteminin duyarlılık ve özgüllükleri Tablo 3'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Enterokoklar, direnç sorunu nedeniyle son yıllarda hastane enfeksiyonu etkeni olarak giderek artan oranlarda görülmektedir⁽¹²⁾. Bunun sonucunda tedavi maliyetleri ve hastanede yatış oranları artmaktadır⁽¹³⁾. Enterokokal enfeksiyonların tedavisinde büyük öneme sahip glikopeptidlere dirençli bakteri oluşumları çok daha ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır⁽¹⁴⁾. Enterokok enfeksiyonları arasında *E. faecalis*'in oranı diğer türlere göre fazla olmasına rağmen, VRE'lerin ortaya çıkmasıyla birlikte bu oran gittikçe düşmüş ve *E. faecium* izolatları daha ön plana çıkmaya başlamıştır⁽¹⁵⁾. Yıllık EARS-NET raporunda *E. faecium* izolatlarında VRE oranının %14.9, *E. faecalis* izolatlarında ise %0-5 arasında olduğu bildirilmiştir⁽¹⁶⁾. ABD'de 1995-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada, *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatları karşılaştırıldığında bütün glikopeptid türevlerine karşı *E. faecium* izolatlarında ciddi bir direnç artışı

saptanmıştır⁽¹⁷⁾. Ülkemizde de Ankara ve İstanbul'da yürütülen çalışmalarda, 467 hastanın %1.9'unda VRE kolonizasyonu belirlenmiş ve bunların tamamının vankomisin ve teikoplanine dirençli *E. faecium* olduğu saptanmıştır⁽¹⁸⁾. Bizim çalışmamızda ise, çalışmaya dâhil edilen 30 VRE suşunun 29 (%96,6)'u *E. faecium* ve 1 tanesi (% 3,3) *E. faecalis* olarak bulunmuştur.

Glikopeptidlere dirençli ilk enterokok olgusu 1988 yılında Uttley ve ark.⁽⁷⁾ tarafından tanımlandıktan sonra dünyada sıklıkla gözlenmiştir. Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde VRE izolatları arasında en çok rastlanan genotip *VanA* tipidir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de en sık gözlenen tip *VanA* olarak belirlenmiştir⁽¹⁹⁾. Bourdon ve ark.'nın⁽²⁰⁾ Fransa'da yaptığı bir çalışmada, 2006-2008 arasında 902 VRE suşu incelenmiş, bu suşların %95'inin *E. faecium*, %4.5'i *E. faecalis* olduğu bildirilmiştir. *E. faecium* suşlarının %66'sında *VanA* ve %34'ünde *VanB* geni saptanmıştır. *E. faecalis* suşlarında ise %83 oranında *VanA* ve %17 oranında *VanB* geni belirlenmiştir. Çalışmamızda tanımlanan 29 *E. faecium* suşunun 27'sinde *VanA* geni saptanırken, yalnızca bir *E. faecium* suşunda *VanA* ve *VanB* geni birlikte saptanmıştır. Hiçbir suşta *VanC* geni saptanmamıştır.

Dombrádi ve ark.'nın⁽²¹⁾ yapmış olduğu bir çalışmada, 17 VRE izolatı Vitek 2 otomatize sistem ve gradient test ile çalışılmıştır. Otomatize sistemle çalışılan örneklerin 10'u hata vermiş ve yanlış fenotiple sonuçlanmıştır. Bu nedenle en güvenilir testin gradient test olduğu saptanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada da

enterokoklarda vankomisin direnci Vitek 2 otomatize sistem ve gradient test yöntemleriyle araştırılmış, iki yöntemin %100 uyumlu olduğu bulunmuştur. Çalışılan 199 enterokok suşunun 25'i her iki yöntemle de vankomisine dirençli olarak saptanmıştır⁽²²⁾. Vitek 2 otomatize sistem ve E-test yönteminin kullanılarak enterokoklarda glikopeptid direncinin araştırıldığı bir çalışmada, 536 enterokok suşunun 79'u (%14.7) her iki yöntemle de vankomisine dirençli olarak belirlenmiştir⁽²³⁾. Shalaby ve ark.⁽²⁴⁾ tarafından 112 hastadan alınan örneklerde Vitek 2 otomatize sistem ile enterokok türleri tanımlanmıştır. Vankomisin direnci E test ile belirlenmiş ve moleküler yöntemle (PCR) *VanA* geninin varlığı saptanmıştır. PCR referans olarak alınmış ve hem E-test hem de Vitek 2 için duyarlılık ve özgüllük %100 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, vankomisin ve teikoplanin direncini belirlemede moleküler yöntem standart olarak kabul edildiğinde gradient testin hem duyarlılığı hem özgüllüğü %100'dür. Çalışmamızda otomatize sistem duyarlı olması gereken 3 suşun tamamını dirençli olarak saptamıştır.

Sonuç olarak, Gradient test yöntemi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında enterokok izolatlarının glikopeptid direncini saptamada güvenilir sonuç vermektedir.

Teşekkür

Katkılarından dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun, 31.03.2015 tarih ve 13 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Finansal Destek: Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığı (BAPB) tarafından 2015-SBE-YL292 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Van Yüzüncü Yıl University Ethics

Committee (03.31.2015-13).

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

Funding: Van Yüzüncü Yıl University Scientific Research Projects Unit (Project No. 2015-SBE-YL292).

KAYNAKLAR

1. Başustaoğlu A. Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (Eds). Gram Pozitif Bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 5. Baskı, 2002:141-58.
2. Aktepe OC, Aşık G, Çiftçi İH, Çetinkaya Z. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2011;41(2):86-90. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2011.086>
3. Güldemir D, Karagöz A, Dal T, Tekin A, Özekinci T, Durmaz R. Hastane kaynaklı enterokok izolatlarının pulsed-field jel elektroforezis yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2015;72(1):1-10. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.94695>
4. Herman DJ, Gerding DN. Antimicrobial resistance among enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(1):1-4. <https://doi.org/10.1128/aac.35.1.1>
5. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram positive cocci. Clin Infect Dis. 2006;42(Suppl1): S25-34. <https://doi.org/10.1086/491711>
6. Robert C, Moellering RC. *Enterococcus* species bovis and *Leuconostoc* species. Principles and Practise of Infectious Disease; Churchill-Livingstone; 5th edition. 2000;2147-53.
7. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin resistant enterococci. Lancet. 1988;1(8575-6):57-8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)91037-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)91037-9)
8. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med. 1988;319(3):157-61. <https://doi.org/10.1056/NEJM198807213190307>
9. Vural T, Şekercioğlu AS, Öğünç D. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. Ankem Derg. 1999;13(1):1-4.
10. Ural O. Nozokomiyal enterokok bakteriyemisi. Hastane İnfeksiyon Derg. 1998;2(4):217-23.
11. Ulusoy S. Çoğul Dirençli Gram Pozitif Bakteriler. In: Doğanay M, Ünal S (Eds) Hastane Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Kitapevi, 2003:247-67.
12. Demirtürk N, Demirdal T. Antibiyotiklerde direnç sorunu. Kocatepe Tıp Derg. 2004;5(2):17-21.

13. Ergani-Özcan A, Naas T, Özhak Baysan B, et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a pediatric unit at a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother. 2008;61(5):1033-9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn066>
14. Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. Infeksi Derg. 2009;23(4):201-9.
15. Çelik C, Uysal EB, Gözel MG, Bakıcı MZ, Elaldı N. Kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin antimikrobiyal direnç paterni. Flora. 2013;18(2):83-9.
16. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. 2017. [<https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>]. (Erişim Tarihi: 04.01.2020)
17. Rudy M, Zientara M, Bek T. Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. Pol J Microbiol. 2005;54(1):77-80.
18. Aygün H, Memikoğlu OK, Tekeli A, Azap A, Yörük F. Hastanede yatan riskli hasta gruplarında vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunun süreyansı. Turk Anest Rean Der. 2008;36(3):168-73.
19. Kılıç A, Şenses Z, Aydoğan H, Başustaoğlu A. Klinik örneklerden izole edilen vankomisin dirençli enterokokların moleküler analizi. Mikrobiyol Bul. 2006;40(4):295-9.
20. Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, et al. Changing trends in vancomycin resistant enterococci in French hospitals. J Antimicrob Chemother. 2011;66(4):713-21. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq524>
21. Dombrádi Z, Bihari Z, Horváth KI, Szabó J. Comparison of the VITEK 2 system with the E-test for the determination of glycopeptide susceptibility of *VanA* and *VanC* positive enterococci. Acta Microbiol Immunol Hung. 2010;57(3):157-63. <https://doi.org/10.1556/AMicr.57.2010.3.1>
22. Uludağ Altun H, Ataman Hatipoğlu Ç, Bulut C, Köseoğlu Eser Ö, Demiröz AP. Vankomisine dirençli enterokokların süreyansında GeneXpert® *VanA/VanB* PCR sistemi ile kültür yönteminin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2014;48(4):538-44. <https://doi.org/10.5578/mb.8848>
23. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. İdrar kültüründen izole edilen enterokok türlerinin antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2014;44(3):107-13. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2014.107>
24. Shalaby MM, Eshra KA, El-Naghy WS, El-Sharaby RM. Comparative study between molecular and non-molecular methods used for detection of Vancomycin Resistant Enterococci in Tanta University Hospitals, Egypt. Life Scien J. 2016;13(1):71-8. <https://doi.org/10.7537/marslsj1301s1608>

Kandidemi Etkenlerinin Tür Dağılımı ve Duyarlılıkları: Hastanemizde Ampirik Antifungal Tedavi Politikası Değiştirilmeli mi?

Distribution and Susceptibilities of Pathogens causing Candidemia: Should Empirical Antifungal Treatment Policy Be Changed in Our Hospital?

Halil Er[®], Nisel Özkalay Yılmaz[®], Yeşer Karaca Derici[®], Sevgi Hancı[®], Şükran Saba Çopur[®]

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Er H, Özkalay Yılmaz N, Karaca Derici Y, Hancı S, Saba Çopur Ş. Kandidemi etkenlerinin tür dağılımı ve duyarlılıkları: Hastanemizde ampirik antifungal tedavi politikası değiştirilmeli mi? Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):150-5.

Öz

Amaç: Son yıllarda, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının artması, immunsupresif tedavi alan ve yoğun bakımda izlenen genel durumu bozuk hasta sayısındaki artış gibi sebeplerle invaziv *Candida* enfeksiyonlarının insidansında artış olmuştur. *Candida* enfeksiyonlarında tür dağılımı ve antifungal duyarlılıklarının bilinmesi yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden bu enfeksiyonların tedavisinin yönetilmesinde önemlidir. Bu çalışmada hastanemizde çeşitli kliniklerde yatan hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin dağılımı, antifungal duyarlılıklarının saptanması ve bu sonuçlara göre hastanemizde uygulanan antifungal tedavi politikasının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Temmuz 2017-Mart 2019 tarihleri arasında kan kültürlerinde (BacT/Alert 3D, BioMérieux, Fransa) üreyen, konvansiyonel ve otomatize (API ID 32C, (BioMérieux, Fransa) ve MaldiTOF MS, (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya)) yöntemlerle tanımlanan *Candida* türlerinin gradient test stripleri (BioMérieux E test, Fransa) kullanılarak yapılan antifungal duyarlılıkları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: İzole edilen 175 *Candida* suşunun 84 (%48)'ü *Candida parapsilosis*, 57 (%32.6)'si *Candida albicans*, 15 (%8.6)'i *Candida glabrata*, 12 (%6.9)'si *Candida tropicalis*, 3 (%1.7)'ü *Candida kefir* olarak saptanırken birer tane *Candida dubliniensis* (%0.6), *Candida famata* (%0.6), *Candida lusitanae* (%0.6) ve *Candida spp.* (%0.6) bulunmuştur. *C. parapsilosis* saptanan örneklerde %54.8 flukonazol, %44.1 vorikonazol, %7.1 posakonazol, %25 itraconazol ve %1.2 anidulafungin direnci saptanmıştır. *C. albicans* saptanan örneklerde flukonazole %8.8, vorikonazole %7, itraconazole %15.8 oranında direnç görülmüştür.

Sonuç: Hastanemizde yatan hastaların kan kültürlerinde *C. parapsilosis*'in en sık izole edilen enfeksiyon etkeni olarak saptanması ve özellikle *C. parapsilosis* türlerinin yüksek flukonazol direnci göstermesi dikkat çekicidir.

Anahtar kelimeler: Kandidemi, antifungal direnç, nozokomiyal enfeksiyon

ABSTRACT

Objective: In recent years, the incidence of invasive *Candida* infections have increased due to the increased use of broad-spectrum antibiotics, the number of patients with immunosuppressive therapy and in the intensive care unit with the impaired condition. Knowing the species distribution and antifungal susceptibilities in *Candida* infections are important in managing the treatment of these infections with high mortality and morbidity. In this study, it was aimed to determine the distribution and antifungal sensitivities of *Candida* species that isolated from blood cultures taken from patients hospitalized in various clinics in our hospital and evaluation of the antifungal treatment policy applied in our hospital according to these results.

Method: Using gradient test strips (BioMérieux E test, France) of *Candida spp.* grown in blood cultures (BacT/Alert 3D, BioMérieux, France), and identified by conventional methods and automated identification systems [API ID 32C, (BioMérieux, France) and MaldiTOF MS, (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)] between July 2017 and March 2019, and their susceptibilities to antifungal agents were determined.

Results: Among the 175 *Candida* strains isolated, 84 (48%) were *Candida parapsilosis*, other identified strains were as follows; *Candida albicans* (n=57; (32.6%), *Candida glabrata* (n=15; 8.6%), *Candida tropicalis* (n=12; 6.9%), *Candida kefir* (n=3; 1.7%), one *Candida dubliniensis* (n=1; 0.6%), *Candida famata* (n=1; 0.6%), *Candida lusitanae* (n=1; 0.6%) and *Candida spp.* (n=1; 0.6%). Antimicrobial resistance rates of isolated *C. parapsilosis* strains against fluconazole (54.8%), voriconazole (44.1%), posaconazole (7.1%), itraconazole (25%) and anidulafungin (1.2%), and of *C. albicans* against fluconazole (8.8%), voriconazole (7%), itraconazole (15.8%) were determined as indicated.

Conclusion: As a result, it is noteworthy that *C. parapsilosis* is the most frequently isolated infection agent in the blood cultures of patients hospitalized in our hospital and that especially *C. parapsilosis* species show high fluconazole resistance.

Keywords: Candidemia, antifungal resistance, nosocomial infection

Alındığı tarih / Received:
27.04.2020 / 27.April.2020

Kabul tarihi / Accepted:
22.01.2021 / 22.January.2021

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

H. Er 0000-0002-8752-2156
N. Özkalay Yılmaz 0000-0001-7435-2461
Y. Karaca Derici 0000-0002-1993-356X
S. Hancı 0000-0002-1198-5277
Ş. S. Çopur 0000-0003-3855-1476

✉ haliler004@hotmail.com

§ Uluslararası XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (4-8 Kasım 2018) SS-043 numarası ile 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)

GİRİŞ

İnvaziv mantar enfeksiyonları içinde mayalar en sık etkenler arasındadır. Bunların içinde ise en sık görülen etken *Candida* cinsi mayalardır⁽¹⁾. İnvazif kandidiyaz, bir dizi klinik durumu kapsar. Bunların en sık görüleni kandidemidir⁽²⁾. Kandidemi, sağlık hizmetleriyle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları arasında dördüncü sırada görülür⁽³⁾. Yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) kritik hastalarda en sık görülen mantar enfeksiyonudur⁽³⁾. YBÜ'nde %33-55 oranında kandidemi sıklığı meydana geldiği tahmin edilmektedir⁽³⁾. Genellikle YBÜ'de en sık kandidemiye neden olan *Candida* türleri sırasıyla *Candida albicans* (%54-70), *Candida glabrata* (%13-15) ve *Candida parapsilosis* (%8-19) olarak saptanmıştır⁽³⁾.

Yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden kandidemi için etken türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılık durumları ülkeden ülkeye, hatta hastaneler arasında bile farklılıklar gösterebilmektedir. Bu çalışmada, hastanemizde çeşitli kliniklerde yatan hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıklarının saptanması, bu sonuçlara göre rutin uygulanan antifungal tedavi politikasının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastanemizde Temmuz 2017-Mart 2019 tarihleri arasında çeşitli kliniklerde yatmakta olan hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Uygun yöntemle alınan kan kültürleri BacT/Alert 3D (BioMérieux, Fransa) cihazında inkübe edilmiştir. Pozitif sinyal veren şişeler %5 koyun kanlı agar ve EMB agara (Becton Dickinson, ABD) pasajlanmış, sonrasında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Gram boyama sonucu maya üremesi saptanan ve/veya maya üremesi olan tüm örnekler germ tüp testi, mısırunu tween 80 agar ve kromojenik agar (BioMérieux, Fransa) görünümü ile konvansiyonel olarak ayrıca API ID 32C (BioMérieux, Fransa) ve MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) ile otomatize olarak tanımlanmışlardır.

İzole edilen mayaların antifungal duyarlılıkları gradient test yöntemi ile yapılmıştır. Üretici firma talimatları doğrultusunda besiyerinde üreyen koloniler alınarak %0.85 NaCl içinde süspanse edilmiş ve 0.5 McFarland bulanıklıkta süspanسیون elde edilmiştir. Hazırlanan maya süspanسیونu %2 glikoz içeren ve MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyerine (Liofilchem, İtalya) eşit şekilde yayılmıştır. Antifungal duyarlılık için kullanılan flukonazol, vorikonazol, posakonazol, itrakonazol, amfoterisin B ve anidulafungin antibiyotiklerini içeren gradient test stripleri (BioMérieux E test, Fransa) besiyerinin yüzeyine uygun şekilde yerleştirilmiş ve 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Bu süre sonunda minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri değerlendirilip European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre yorumlanmıştır⁽⁴⁾. Çalışmada, kontrol suşu olarak *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *Candida krusei* ATCC 6258 kullanılmıştır.

Aynı hastalardan ardışık gönderilen kan kültürlerinde üreyen aynı tür ve duyarlılığa sahip izolatlardan ilki çalışmaya alınmıştır.

BULGULAR

Çalışmanın kapsadığı tarihlerde 175 hastanın kan kültüründe *Candida* cinsi maya üremesi belirlenmiştir. Hastaların 87 (%49.7)'si erkek olarak saptanırken, 88 (%50.3)'i kadın olarak bulunmuştur.

Hastaların 116 (%66.3)'sü yoğun bakım hastası olup, bu hastaların 14 (%8)'ü çocuk yoğun bakım ünitesinde yatmaktadır. Kalan 59 (%33.7) hasta ise servislerde yatan hastalardan oluşmaktadır ve bu hastaların 21 (%12)'i çocuk hastadır.

Kandidemi saptanan 175 örnekten 84 (%48)'ü *C. parapsilosis*, 57 (%32.6)'si *C. albicans*, 15 (%8.6)'i *C. glabrata*, 12 (%6.9)'si *Candida tropicalis*, 3 (%1.7)'ü *Candida kefyr* olarak saptanmıştır. Ayrıca birer tane *Candida dubliniensis* (%0.6), *Candida famata* (%0.6) ve *Candida lusitanae* (%0.6) tanımlanmıştır. Bir örnek API ID 32C ve MALDI-TOF MS ile iki kez çalışılmış, ancak tür düzeyinde tanımlama sağlanamayınca

Tablo 1. Hastanemizde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* tür dağılımı; % (n).

<i>Candida</i> türü (n)	Yoğun Bakımlar*	Çocuk Yoğun Bakım	Dahili Birimler [†]	Cerrahi Birimler [‡]	Çocuk Servisi	Toplam [§]
<i>C. parapsilosis</i> (84)	67.8 (57)	5.9 (5)	9.5 (8)	2.4 (2)	14.3 (12)	48 (84)
<i>C. albicans</i> (57)	49.1 (28)	7 (4)	29.8 (17)	7 (4)	7 (4)	32.6 (57)
<i>C. glabrata</i> (15)	46.7 (7)	13.3 (2)	20 (3)	13.3 (2)	6.7 (1)	8.6 (15)
<i>C. tropicalis</i> (12)	50 (6)	16.7 (2)	16.7 (2)	-	16.7 (2)	6.9 (12)
<i>C. kefir</i> (3)	33.3 (1)	-	-	-	66.7 (2)	1.7 (3)
<i>C. dubliniensis</i> (1)	100 (1)	-	-	-	-	0.6 (1)
<i>C. famata</i> (1)	100 (1)	-	-	-	-	0.6 (1)
<i>C. lusitanae</i> (1)	-	100 (1)	-	-	-	0.6 (1)
<i>Candida</i> spp. (1)	100 (1)	-	-	-	-	0.6 (1)
Toplam (N=175)	58.3 (102)	8 (14)	17.1 (30)	4.6 (8)	12 (21)	100 (175)

*Yoğun bakımlar: Anestezi yoğun bakım, cerrahi yoğun bakım, dâhiliye yoğun bakım, noroloji yoğun bakım

[†]Dâhili birimler: Dâhiliye servisi, hematoloji servisi, enfeksiyon hastalıkları servisi

[‡]Cerrahi birimler: Beyin cerrahisi servisi, cerrahi servisi, üroloji servisi

[§]Sütun yüzdesi

Tablo 2. Kandidemi etkenlerinin antifungal direnç oranları, % (n).

Mantar türü (n)	Flukonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	Anidulafungin	Amfoterisin B
<i>C. parapsilosis</i> (84)	54.8 (46)	44.1 (37)	7.1 (6)	25 (21)	1.2 (1)	0 (0)
<i>C. albicans</i> (57)	8.8 (5)	7 (4)	0 (0)	15.8 (9)	0 (0)	0 (0)
<i>C. glabrata</i> (15)	6.7 (1)	-*	-*	-*	0 (0)	0 (0)
<i>C. tropicalis</i> (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Candida</i> spp. (7)	28.6 (2)	-*	-*	-*	-*	-*
Toplam (N=175)	30.9 (54)	23.4 (41)	3.4 (6)	17.1 (30)	0.6 (1)	0 (0)

* EUCAST kriterleri herhangi bir sınır değerleri belirtilmedikleri için "-" ile gösterilmiştir

Candida spp. (%0.6) olarak rapor edilmiştir (Tablo 1).

Yoğun bakımda yatan hastalardan en sık izole edilen tür *C. parapsilosis* (%53.4) olurken, servislere yatan hastalardan en sık izole edilen tür *C. albicans* (%42.4) olarak bulunmuştur.

Candida parapsilosis saptanan örneklerde %54.8 flukonazol, %44.1 vorikonazol, %7.1 posakonazol, %25 itrakonazol ve %1.2 anidulafungin direnci saptanmıştır. Amfoterisin B dirençli izolat bulunmamıştır. *C. albicans* saptanan örneklerde flukonazole %8.8, vorikonazole %7, itrakonazole %15.8 oranında direnç görülmüş olup posakonazol, anidulafungin ve amfoterisin B'ye dirençli izolat görülmemiştir. *C. glabrata* saptanan 15 örnekten 1 (%6.7) tanesi flukonazol dirençli bulunurken, anidulafungin ve amfoterisin B'ye dirençli suş saptanmamıştır. *C. tropicalis* olarak tanımlanan örneklerde dirençli bir örnek görülmemiştir (Tablo 2).

TARTIŞMA

Lokalize mukokutanöz kandidiyazdan farklı olarak invaziv kandidiyazis, YBÜ'nde yatan hastalar için özellikle önemli, yaygın bir enfeksiyondur⁽⁵⁾. Terapötik immünosupresyon, antibakteriyel tedavilerdeki gelişmeler, kemoterapiye bağlı nötropeni gibi nedenlerle invaziv kandidiazis yaygın görülmeye başlamıştır⁽⁵⁾. *Candida* türleri, kritik hastalarda en yaygın invaziv mantar enfeksiyonu etkenidir ve YBÜ'nde kandidemi oranı, YBÜ dışı ortamlara göre yaklaşık 10 ila 20 kat daha fazladır⁽⁵⁾. Kandidemi etkeni olarak 15'ten fazla *Candida* türü saptanmış olsa da, hemen hemen çoğu kandidemi enfeksiyonlarının etkeni *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'dir⁽⁵⁾. Bu dağılım genellikle birbirine benzer olmakla birlikte, coğrafik bölgelere göre değişiklik göstermektedir. İnvaziv kandidiyazis'in etkenleri ile ilgili dünya genelinde yapılan kapsamlı bir derlemede en sık karşılaşılan tür *C. albicans* (%50-70) bulunmuştur. Avrupa'da dağılımında yine *C. albicans* (% 40-68) ilk sırayı

almaktadır. *C. albicans*'ı sırası ile *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* izlemektedir⁽⁶⁾. Pfaller ve ark.'nın⁽⁸⁾ yaptıkları Asya, Avrupa, Latin Amerika ve Kuzey Amerika bölgelerinde 79 farklı tıp merkezinden elde edilen toplam 2.085 klinik *Candida* izolatını inceledikleri çok merkezli bir çalışmada en sık etken *C. albicans* (%48.41) bulunmuştur. Bunu %18 ile *C. glabrata*, %17.2 ile *C. parapsilosis* %10.5 ile *C. tropicalis*, %1.9 ile *C. krusei* izlemiştir. Ayrıca direnç oranlarının bölgesel olarak değişken olduğunu bildirmişlerdir⁽⁷⁾. Yapar ve ark.'nın⁽⁸⁾ ülkemizde yaptıkları bir çalışmada, %45.8 oranında *C. albicans*, %24.1 oranında *C. tropicalis*, %14.5 oranında *C. parapsilosis*, %4.8 oranında *C. glabrata* ve %3.6 oranında *C. kefyur* saptamışlardır. Kan kültürlerinden üreyen *Candida* türlerinin dağılımı ile ilgili Sarıgüzel ve ark.'nın⁽⁹⁾ yaptıkları çalışmada, etken olarak %38.8 oranında *C. albicans* bulurken %38.3 oranında *C. parapsilosis* saptamışlardır. En sık kandidemi etkeni olarak *C. albicans* saptanmasına rağmen, Kuşoğlu ve ark.'nın⁽¹⁰⁾ bildirdiği gibi *C. parapsilosis*'in (%44) en sık kandidemi etkeni olduğu çalışmalar da mevcuttur. *C. parapsilosis*'i *C. tropicalis* (%13), *C. albicans* (%8.8), *C. kefyur* (%8.8), *C. krusei*, *C. glabrata* ve diğer türler izlemektedir. Yine benzer şekilde Etiz ve ark.'nın⁽¹¹⁾ 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, kandidemi etkeni en sık tür *C. parapsilosis* (%33.9) bulmuşlardır. Bunu *C. albicans* (%27.5), *C. tropicalis* (%16) ve *C. glabrata* (%9.6) takip etmektedir. Bu çalışmada değerlendirilen 175 kandidemi etkeni arasında en sık *C. parapsilosis* (%48) görülürken, bunu *C. albicans* (%32.6), *C. glabrata* (%8.6), *C. tropicalis* (%6.9), *C. kefyur* (%1.7), *C. dubliniensis* (%0.6), *C. famata* (%0.6) ve *C. lusitaniae* (%0.6) izlemiştir. Ayrıca 1 izolat hem API32C ile hem de MALDI-TOF MS ile çalışılmış ancak tür düzeyinde tanımlama yapılamamış sonrasında *Candida spp.* olarak raporlanmıştır. Genel olarak kandidemi etkenlerinin dağılımını inceleyen çalışmalarda *C. albicans* türlerinin daha yaygın olduğu görülmekle beraber, hastanemizde özellikle yoğun bakım ünitelerinde *C. parapsilosis*'in baskın olduğu dikkatimizi çekmiştir.

Kandidemi saptanan hastaların etkin tedavi edilebilmesi için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antifungal duyarlılık testlerinin hızlı ve doğru yapılması önemlidir. Bunun için CLSI ve EUCAST tarafından

antifungal duyarlılık testlerinde sıvı mikrodilüsyon yapılması önerilmektedir^(12,13). Ancak zaman alıcı ve yoğun emek isteyen bu yöntem özellikle rutin hizmet yükü ağır olan kurumlarda her zaman uygulanamamaktadır. Bu durumda uygulaması daha kolay olan gradient test yöntemleri kullanılabilir. Gradient test yöntemi ile mikrodilüsyon yönteminin duyarlılıklarını karşılaştıran yayınlar mevcuttur. Özcan ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ gradient test yöntemi ve standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde ettikleri MİK değerlerini karşılaştırmış ve flukonazol için %80.4; amfoterisin B için %84.7; vorikonazol için %93.4 oranında uyum saptamışlardır. Benzer başka bir çalışmada, gradient test ve sıvı mikrodilüsyonun amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin için 48 saat sonrası MIC değerleri %88.7 ile %98.1 arasında uyumlu olduğu saptanmıştır⁽¹⁵⁾. Hastanemiz laboratuvarında rutin çalışmalarda gradient test yöntemi ile antifungal duyarlılıkları çalışılmaktadır.

Flukonazol, kandidemi tedavisinde toksisitesinin az olması ve etki spektrumu nedeniyle yaygın kullanılan bir antifungal ilaçtır⁽¹¹⁾. Çeşitli çalışmalarda *Candida* türü mayalarda farklı oranlarda flukonazol direnci gösterilmiştir⁽¹¹⁾. Kan kültürlerinden izole edilen 6082 *Candida* örneğinin direnç oranlarının saptandığı çok merkezli bir çalışmada, tüm *Candida* türlerinde %3 flukonazol direnci belirlenmiştir⁽¹⁶⁾. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Etiz ve ark.'nın⁽¹¹⁾ kan kültüründen izole ettikleri *C. albicans* türlerinde %1.3 flukonazol direnci bulurken, *C. parapsilosis* türlerinde ise flukonazole %17.9 oranında direnç saptamışlardır⁽¹¹⁾. Tüm *Candida* türlerinde %9.2 oranında flukonazol direnci belirlemişlerdir. Sarıgüzel ve ark.'nın⁽⁹⁾ kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinde direnç oranlarının Vitek 2 otomatize sistem ile değerlendirdikleri çalışmada, flukonazol için *C. albicans* türlerinde %2.9, *C. parapsilosis* türlerinde %10.4 oranında direnç saptamışlardır. Kan kültürü örneklerinde yapılan benzer bir çalışmada, *C. albicans* türlerinde %11, *C. parapsilosis* türlerinde %7, *C. glabrata* türlerinde %20 flukonazol direnci gösterilmiştir⁽¹⁷⁾. Hastanemizde yaptığımız çalışmada, *C. albicans* türlerinde %8.8, *C. parapsilosis* türlerinde %54.8 flukonazol direnci görülmüştür. Tüm *Candida* türlerinde ise %30.3 oranında direnç saptanmıştır. Çalışmamızdaki bulgularla benzer şekilde Fidan ve

ark.⁽¹⁸⁾ yaptıkları bir çalışmada, yoğun bakımda yatmakta olan hastaların kan kültürlerinde üreyen *C. parapsilosis* örneklerinde %78.6 oranında flukonazol direnci saptamışlardır. Çalışmamızdaki flukonazol direnç oranı özellikle *C. parapsilosis* türlerinde yüksek olmakla birlikte, incelenen çalışmalarda farklı oranlarda direnç bildirildiği görülmektedir. Bu durumda kandidemi şüphesi hastalarda etken tür ve antifungal duyarlılık profilleri tam belirlenmeden önce ampirik olarak flukonazol başlama kararında dikkatli olunması gerektiği düşünülmektedir.

Anidulofungin ekinokandin türevi antifungal bir ilaç olup kandidemi tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Çok merkezli yapılan epidemiyolojik surveyans çalışmalarında anidulofungine karşı *Candida* türlerinde %0-0.3 oranında direnç belirlenmiştir⁽¹⁶⁾. Yaptığımız çalışmada yalnızca bir *C. parapsilosis* türünde (%1.2) direnç saptanmıştır. Tüm *Candida* türlerinde ise bu oran %0.6 olarak karşımıza çıkmaktadır. Bulgularımız literatürdeki verilere uyumlu görülmektedir.

Amfoterisin B, polien türevi bir antifungal ilaçtır ve *Candida* türlerine genellikle etkilidir. Ülkemizde Bayram ve ark.⁽¹⁹⁾ yaptıkları bir çalışmada, *Candida* türlerinde amfoterisin B direnci %1.9 oranında bulunmuştur. Benzer şekilde Öztürk ve ark.⁽²⁰⁾ yaptıkları çalışmada ise, tüm *Candida* türlerini amfoterisin B'ye karşı duyarlı bulmuşlardır. Sarıgüzel ve ark.⁽⁹⁾ *C. parapsilosis* suşlarında %8.9 amfoterisin B direnci, *C. albicans* türleri için %5.8 amfoterisin B direnci saptamışlardır. Kan kültürü örneklerinde yapılan benzer bir çalışmada, *C. albicans* türlerinde %9 amfoterisin B direnci görülürken, bu oran *C. parapsilosis* türlerinde %7, *C. glabrata* türlerinde %10 olarak bulunmuştur⁽¹⁷⁾. Yapılan çalışmalarda, direnç oranları %0-10 arası değişmektedir. Hastanemizde yapılan çalışmada tüm *Candida* türlerinin amfoterisin B ye duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu verilerin ülkemiz verileri ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, hastanemizde özellikle yoğun bakımda yatan hastaların kan kültürlerinde *C. parapsilosis* en sık izole edilen enfeksiyon etkeni olarak saptanmıştır. Antifungal direnç oranlarının türler arası değişiklik

gösterdiği görülmüştür. Özellikle *C. parapsilosis* türlerinin yüksek flukonazol direnci göstermesi dikkat çekicidir. Yapılan çalışmalarda, gradient test yöntemi ile sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasında yüksek oranda uyum gösterilmesine rağmen, gradient test yöntemi ile dirençli saptanan suşların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile doğrulanması gerektiği düşünülmektedir.

Candida enfeksiyonlarının tedavisi ile ilgili olarak son kılavuzlar, flukonazol yerine bir ekinokandin (Örneğin, kaspofungin, anidulafungin) ile birinci basamak tedaviyi önermektedir⁽²¹⁾. Bu öneriyi destekleyen kanıtlar, esas olarak flukonazole dirençli *Candida* türlerinin yaygınlığının artması ve kandidemi tedavisinde ekinokandinlerin azollere kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek bir etkinlik gösterdiğinin klinik çalışmalarla gösterilmiştir⁽³⁾.

Bu durum kandidemi gibi invaziv *Candida* enfeksiyonlarında tür düzeyinde tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasının ampirik tedavide yol gösterici olacağı ve hastanemiz kliniklerinde ampirik antifungal kullanım politikalarının bu bilgiler ışığında yine değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun, 13.05.2020 tarih ve 2020/16-7 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the SBÜ Tepecik Education and Research Hospital Ethics Committee (05.13.2014-2020/16-7).

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

KAYNAKLAR

1. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(2):142-51. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70218-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70218-8)
2. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A

- narrative review. Eur J Intern Med. 2016;34:21-8.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
3. Bassetti M, Giacobbe DR, Vena A, Wolff M. Diagnosis and treatment of candidemia in the intensive care unit. Semin Respir Crit Care Med. 2019;40(4):524-39.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1693704>
 4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICsVersion 8.1, 2017.
 5. Epelbaum O, Chasan R. Candidemia in the intensive care unit. Clin Chest Med. 2017;38(3):493-509.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.010>
 6. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Ther Clin Risk Manag. 2014;10:95-105.
<https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>
 7. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). J Clin Microbiol. 2011;49(1):396-9.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01398-10>
 8. Yapar N, Pullukcu H, Avkan-Oguz V, et al. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: A multicenter case-control study. Med Mycol. 2010;49(1):26-31.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.501344>
 9. Mutlu Sarıgözel F, Koç AN, Karagöz S. Kan kültürlerinden izole edilen maya türlerinin Vitek 2 sistemi ile tanımlanması ve antifungal duyarlılıkları. Harran Univ Tıp Fak Derg. 2015;12(2):261-8.
 10. Kuşoğlu H, Besli Y, Gündeş S, Akyar I. İki yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. 7. Türkiye Ekmud Uluslararası Kongresi 8-13 Mayıs 2018, Antalya; 2018:PS-013.
 11. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 2015;29(3):105-13.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2015.0105>
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 3th Reference method for broth dilution anti-fungal susceptibility testing of yeasts (M27-A3). Wayne, PA, 2008.
 13. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. EUCAST antifungal MIC method for yeasts. EUCAST E.DEF 7.3.1; 2017.
 14. Özcan SK, Mutlu B, Dündar D, Willke A. Comparison of broth microdilution and E-test methods for the antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. strains isolated from blood cultures. Mikrobiyol Bul. 2010;44(2):263-71.
 15. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. J Antimicrob Chemother. 2007;59(4):767-71.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkl555>
 16. Grossman NT, Chiller TM, Lockhart SR. Epidemiology of echinocandin resistance in *Candida*. Curr Fungal Infect Rep. 2014;8(4):243-8.
<https://doi.org/10.1007/s12281-014-0209-7>
 17. Kılınçel Ö, Akar N, Karamurat ZD ve ark. Kan kültürlerinde izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2018;48(4):256-63.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.256>
 18. Fidan EE, Karabulut S, Çerikçioğlu N, Erdin B N, Kılıç PE. İstanbul'da bir devlet hastanesinde YBÜ hastalarının kan kültürlerine izole edilen *Candida parapsilosis* kökenlerinde azollere karşı yüksek MİK değerleri. 13. Antimikrobik Kemoterapi Günleri 6-8 Nisan 2018, İstanbul; 2018:O-27.
 19. Bayram Y, Gültepe B, Özlük S, Güdücüoğlu H. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* kökenlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. Van Tıp Derg. 2012;19(4):177-81.
 20. Öztürk T, Özseven AG, Sesli Çetin E, Kaya S. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. Kocatepe Tıp Derg. 2013;14(1):17-22.
<https://doi.org/10.18229/ktd.91638>
 21. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2015;62(4):e1-50.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ933>

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'dan Elde Edilen Fajın Karakterizasyonu

Characterization of Phage Obtained from Methicillin -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Özlem Ulusan Bağcı[®], Fikret Şahin[®], Mehmet Kıyan[®]

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

Atf/Cite as: Ulusan Bağcı Ö, Şahin F, Kıyan M. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'dan elde edilen fajın karakterizasyonu, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):156-62.

Öz

Amaç: Mevcut olan bütün antimikrobiyallere dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının ortaya çıkması ve yeni antibiyotik bulunamaması araştırmacıları antibiyotiklerin keşfi ile popülerliğini kaybetmiş olan faj tedavisine yönlendirmiştir. Rekombinant teknolojinin gelişimi bakteri ölümünü kontrollü olarak sağlayan lizojenik rekombinant fajların oluşturulması düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Bunun için manipülasyonu kolay küçük boyutlu fajlara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, tedavide güvenle kullanılacak küçük boyutta lizojenik bir bakteriyofajın tanımlanmasıdır.

Yöntem: Bu çalışmada, küçük bir faj içerdiği bilinen MRSA suşundan faj ekstrakte edilerek sekans analizi sonucunda gen ve protein haritası çıkarılmıştır.

Bulgular: Faj; kuyruk proteinlerini kodlayan genler içermesi nedeniyle Caudoviralese; genom büyüklüğü ve dizilimi göz önünde bulundurularak Podoviridae sınıfına dâhil edilmiştir.

Sonuç: Bugüne kadar NCBI veritabanına yüklenmiş yalnızca 16 adet Podoviridae ailesinden faj bulunmakta olup, bu çalışmada tanımlanan faj ise on yedincidir. Genomdaki AOÇ'lerin (Açık Okuma Çerçevesi) yalnızca %41.4'ü NCBI BLAST programı kullanılarak proteinlerle eşleştirilebilmiştir. Yapılan son araştırmalarda, çalışmamızla uyumlu olarak bakteriyofaj genomundan olduğu tahmin edilen AOÇ'lerin %50-75'inin GenBank'ta karşılığı olmadığı belirtilmiştir. Bakteriyofajları daha iyi anlayabilmek ve faj terapisinde fajlardan daha iyi yararlanabilmek için daha fazla fajın dizilenmesi, genomlarının ve karşılık geldiği proteinlerin bulunması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızın, rekombinant faj terapilerinde güvenle kullanılacak lizojenik bir fajın gen ve proteinlerinin tanımlanmış olması nedeniyle literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Bakteriyofaj, faj tedavisi, *Staphylococcus*

ABSTRACT

Objective: The emergence of *Staphylococcus aureus* strains resistant to all antimicrobials and failure to discover new antibiotics have led researchers to phage therapy, which lost popularity after the discovery of antibiotics. The development of recombinant technology introduced the idea of creating lysogenic recombinant phages that provide controlled bacterial death and this required small- sized phages that were easy to manipulate. Our aim is to identify small-sized lysogenic bacteriophages that can be used safely in therapy.

Method: The gene and protein map of the phage was created by analysis of sequencing after extracting a phage from the MRSA strain that is known to contain a small phage.

Results: The phage was classified in Caudovirales spp. as it contains genes encoding tail proteins, and in Podoviridae spp. due to its genomic size and arrangement.

Conclusion: To date, there are only sixteen phages from Podoviridae family uploaded on NCBI, and the phage described in this study is the seventeenth one. Only 41.4% of the ORFs (Open Reading Frames) in the genome could be matched with proteins using the NCBI BLAST. Recent studies suggest that 50-75% of bacteriophage ORFs do not correspond to any organism in GenBank. For better understanding of bacteriophages and their utilization in phage therapy, it is essential to sequence greater number of phages, and to discover their genomes and corresponding proteins. Since the genes and proteins of a lysogenic phage that can be used safely in recombinant phage therapies have been identified in our study, it will contribute to the relevant literature.

Keywords: Bacteriophage, phage therapy, *Staphylococcus*

Alındığı tarih / Received:

13.10.2020 / 13.October.2020

Kabul tarihi / Accepted:

15.02.2021 / 15.February.2021

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

Ö. Ulusan Bağcı 0000-0002-9695-5703

F. Şahin 0000-0002-1283-8025

M. Kıyan 0000-0002-6748-2070

✉ drozlemulusan@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

Staphylococcus aureus hastane veya toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen ve oldukça ciddi sonuçlar doğurabilen önemli bir patojen mikroorganizmadır⁽¹⁾. Ayrıca antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirebilme potansiyeli yüksek olan bir mikroorganizmadır. En eski antibiyotiklerden olan penisilinden, en yeni antibiyotiklerden olan linezolid kadar kazanılmış direnci mevcuttur^(2,3). Metisilin 1960 yılında keşfedilmiştir ve bundan yalnızca bir yıl sonra Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) salgınlar yapmaya başlamış, hem hastanelerde hem toplumda hızla yayılmıştır⁽⁴⁾. Antibiyotik direncinin giderek yayılması ve mevcut olan bütün antimikrobiyallere dirençli *S. aureus* suşlarının ortaya çıkma olasılığına karşılık yeni antibiyotiklerin geliştirilememesi araştırmacıları antibiyotiklerin keşfedilmesi ile popülerliğini kaybetmiş olan faj tedavisine tekrardan yönlendirmiştir⁽⁵⁾.

Bakterileri enfekte eden ve bakteri kaynaklarını kullanan virüsler, bakteriyofaj olarak tanımlanırlar. Bakteriyofajlar litik (virülan) ve lizojenik (ılımlı) olmak üzere ikiye ayrılırlar⁽⁶⁾. *Caudovirales* olarak adlandırılan kuyruklu fajlar, bilinen tüm fajların %96'sını oluşturur ve sıklıkla çevresel kaynaklardan izole edilebilir. Fizikokimyasal profil, genom ve morfolojilerine göre üç aileye ayrılırlar⁽⁷⁾. Kuyruk kısmı kasılabilen *Myoviridae* ailesi fajların %25'ini, uzun, kasılmayan kuyruğa sahip olan *Siphoviridae* ailesi fajların %61'ini ve kısa kuyruğa sahip olan *Podoviridae* ailesi %14'ünü oluşturmaktadır⁽⁸⁾. Morfolojik yapıların ötesinde, fajların genomik özellikleri diğerlerinden oldukça farklıdır. *Podoviridae* ailesindeki virüsler en küçük genoma (20 kbç) sahipken, *Siphoviridae* ailesindeki virüsler orta büyüklükte bir genoma (40 kbç), *Myoviridae* ailesindeki virüsler ise en büyük genoma (125 kbç) sahiptir⁽⁹⁾.

Podoviridae ailesindeki bakteriyofaj genomlarının *Siphoviridae* ailesinden farklı olduğu bulunmuştur⁽⁹⁻¹¹⁾. DNA paketlenmesi, kapsid yapısı, kuyruk yapısı ve lizojeniye ilişkin genlere ek olarak, fonksiyonel olmayan genler de içerirler. *Siphoviridae* ailesinden farklı olarak, gen kategorileri birbirinden belirgin bir şekilde ayrılmış değildir, genellikle

kuyruk ve lizisle ilişkili genler üst üste gelmektedir. *Myoviridae* ailesindeki fajların genomik incelemesi sonucunda *Escherichia coli* T4 fajıyla büyük benzerlik gösterdikleri bulunmuştur⁽¹²⁾.

1950'lere kadar faj tedavisi için kullanılan fajlar, temel olarak bakterilerin doğrudan ölmesine neden olan litik özellikteki fajlardır. Bu tedavi yönteminin, bakterilerin ani ölümü nedeniyle endotoksik şok gibi istenmeyen sonuçlara yol açtığı bilinmektedir. Rekombinant teknolojinin geliştirilmesi, bakteri ölümünü kontrol edebilen gen içeren lizojenik rekombinant fajların oluşturulması düşüncesini akla getirmiştir. Ancak, bu amaçla manipülasyonu ve tedavide kullanımı kolay küçük lizojenik fajlara gereksinim vardır. Bu çalışmada amacımız, bu kriterleri karşılayacak bir faj tanımlamak, bu fajın gen haritasını ve proteinlerini saptayarak faj veri bankasına katkıda bulunmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma suşu: Şahin ve ark.⁽¹³⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, 2004-2005 yıllarında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran hastalardan toplanan örneklerde 27 *S. aureus* suşu izole edilmiş ve bu bakterilerin 23 tanesinde bakteriyofaj saptanmıştır. Faj DNA'ları *Hinfi* enzimi ile kesilmiş ve "Restriction Fragment Length Polimorfizm" (RFLP) analizi yapılmıştır. Bu analizle fajlardan birinin diğerlerinden çok daha küçük genoma sahip olduğu ve rekombinant lizojenik fajların hazırlanması için uygun olacağı düşünülmüştür.

Faj izolasyonu: İçinde faj olduğu bilinen MRSA suşunun kanlı agara ekimi yapılmıştır. Faj ekstraksiyonu için Kaneko ve ark.⁽¹⁴⁾ bulduğu, Şahin ve ark.⁽¹³⁾ tarafından modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Üreyen kolonilerden bir tane alınarak beyin kalp infüzyon ekstraktına atılmış, üç saat boyunca 37°C'de bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra 1 g/ml'lik son konsantrasyonda mitomisin C ilave edilmiş ve beş saat daha inkübe edilmiştir. Bakteriler 10.000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatana, 0.2 µm'lik bir filtreden iki kere geçirilmiştir. Faj içeren süpernatana, oda sıcaklığında DNaz I ve RNaz A eklendikten sonra bir saat bekletilmiş ve daha

sonra %10'luk son konsantrasyonda polietilen glikol 6.000 ilave edilmiştir. +4°C'de 12 saat süreyle inkübasyondan sonra 10 dakika boyunca 11.000 g'de santrifüj edilmiş ve çökelti 1 mL Tris EDTA tamponu ile süspansiyon edilmiştir ve devamında DNA ekstraksiyonuna geçilmiştir.

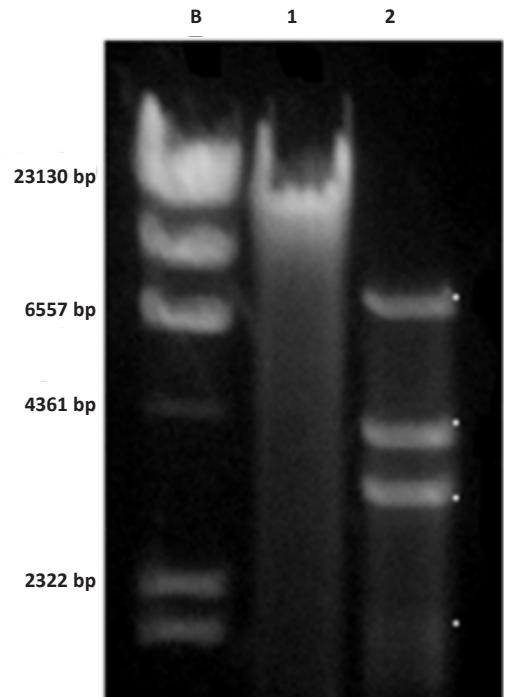
Faj DNA ekstraksiyonu: DNA ekstraksiyonuna 1 mL lizis tamponu (0.1 mol/L NaCl; 0.21 mol/L Tris-HCl; 0.05 mol/L EDTA, pH=8; %0.5 SDS) içerisine Proteinaz K (100 g/ml) eklenerek başlanmıştır. DNA ekstraksiyonu daha sonra guanidium tiyosiyanat yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup, lizis tamponu üzerine 6M guanidium tiyosiyanat (SERVA, 593840) ilave edilmiştir. Silika 20-50 µl eklenerek çalkalayıcı üzerinde on dakika inkübe edilmiş ve devamında 6.000 rpm'de bir dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak DNA, %95'lik etanol ile çöktürülmüş ve 100 µl ddH₂O içerisinde süspansiyon edilmiştir.

Faj DNA'sının pBluescript SK (pBSK) vektörüne klonlanması: Faj DNA'sı *HindIII* enzimi ile kesildikten sonra %1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve faj genomu dört parçaya (insert) ayrılmıştır. Gen parçaları dört ayrı pBSK vektörüne klonladıktan sonra, sekans analizi için dış merkeze gönderilmiştir. Sekans analizi sonuçları NCBI BLAST programında ayrıntılı olarak analiz edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada tanımlanan faj *Staphylococcus phage sml* olarak adlandırılmıştır. Fajın *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle zaman Şekil 1'de gösterilen şekilde boyutları büyükten küçüğe 6.500, 4.000, 3.000 ve 2.000 bç olan dört insertten oluştuğu görülmektedir. Sonrasında dört insert, dört boş pBSK vektörüne klonlanarak sekans analizi elde edilmiştir. Insert klonlanmış dört plazmid Şekil 2'de gösterilmiştir. Dizi sonuçları NCBI BLAST programı (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) kullanılarak değerlendirilmiş, fajın genomundaki genler tarafından kodlanan proteinler saptanmıştır (Şekil 3). Fajın tüm genom sekans analizi FASTA formatında GitHub depo alanında [https://gist.github.com/ulusanozlem/132f889c398dfe9bf44053d52d9414bd] sunulmaktadır.

Sekanslamadan sonra, NCBI Açık Okuma Çerçevesi (AOÇ) bulucu program genom boyutunu ve fajdaki AOÇ'leri bulmak için kullanılmıştır. Fajın genom büyüklüğü 20.227 bç'dir ve sadece ATG kodonuyla başlayan 41 AOÇ içerir. En uzun AOÇ 1911 bç ve en kısa olanı 78 bç'dir. Kırk bir AOÇ'den 17 tanesinin (%41.4) protein karşılığı saptanabilmiştir. Bunlardan 18 tanesi (%43.9) herhangi bir protein ile eşleştirilememiş ve 6'sı (%14.6) fonksiyonu bilinmeyen hipotetik protein olarak değerlendirilmiştir. Fajın genomik özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir. AOÇ'lerin başlangıç ve bitiş nükleotitleri ve uzunluğu, AOÇ'lerin buldukları iplikçik, genlerin karşılık geldiği protein ve proteinlerin fonksiyonları Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 1. *HindIII* ile kesilmiş faj genomunun agaroz jel görüntüsü [(B) Lambda DNA/*HindIII* belirteç (Bantlar bç olarak büyüklükleri ile birlikte verilmiştir).

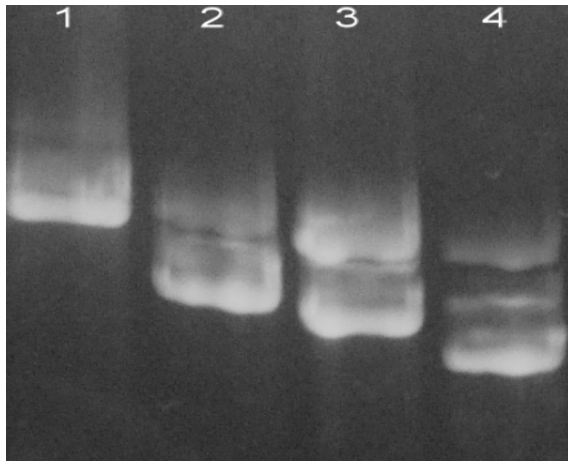
(1) Faj DNA'sı; (2) *HindIII* ile kesilmiş faj DNA'sı]

Tablo 1. *Staphylococcus phage sml* lizojenik bakteriyofajına ait genom özellikleri.

Faj Genomunun Özellikleri	
Özellik	Değer
Genom büyüklüğü (bç)	20227
AOÇ sayısı	41
En uzun AOÇ (bç)	1911
Ortalama AOÇ uzunluğu (bç)	503
En kısa AOÇ (bç)	78
Guanin+Sitozin içeriği (%)	33.96

Tablo 2. AOÇ'lerin özellikleri (başlangıç nükleotidi, bitiş nükleotidi, uzunluk, iplikçik, proteinin adı, fonksiyonu).

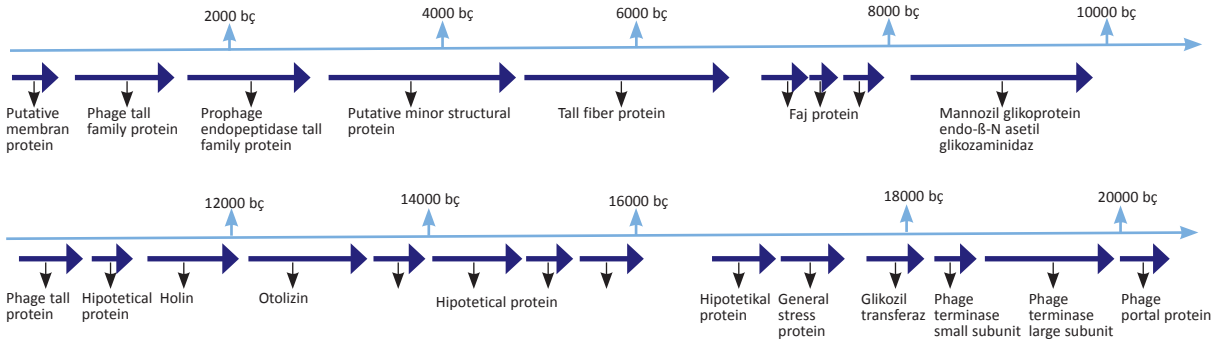
AOÇ	Başlangıç (bç)	Bitiş (bç)	Uzunluk (bç)	İplikçik (pozitif/negatif)	Proteinin adı	Fonksiyonu
AOÇ 1	55	378	324	Pozitif	"Putative membran protein"	Baş yapısı
AOÇ 2	305	400	96	Pozitif	-	-
AOÇ 3	479	369	111	Negatif	-	-
AOÇ 4	391	1338	948	Pozitif	"Phage tail family protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 5	1347	3248	1902	Pozitif	"Prophage endopeptidase tail family protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 6	3055	3270	216	Pozitif	-	-
AOÇ 7	3263	5173	1911	Pozitif	"Putative minör structural protein"	Baş yapısı
AOÇ 8	5238	5109	150	Negatif	-	-
AOÇ 9	5173	6699	1824	Pozitif	"Tail fiber protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 10	6996	7373	378	Pozitif	Faj proteini	-
AOÇ 11	7377	7550	174	Pozitif	Faj proteini	-
AOÇ 12	7588	7433	156	Negatif	-	-
AOÇ 13	7589	7888	300	Pozitif	Faj proteini	-
AOÇ 14	8026	9924	1899	Pozitif	Mannozil glikoprotein endo-β-N asetil glikozaminidaz	Lizis
AOÇ 15	9998	9897	102	Negatif	-	-
AOÇ 16	10036	9902	135	Negatif	-	-
AOÇ 17	9936	11069	1134	Pozitif	"Phage tail protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 18	11176	11581	396	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 19	11064	11597	438	Pozitif	"Holin"	Lizis
AOÇ 20	12018	13490	1473	Pozitif	Otolizin	Lizis
AOÇ 21	13686	13868	183	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 22	13846	13965	120	Pozitif	-	-
AOÇ 23	13943	13830	114	Negatif	-	-
AOÇ 24	13971	13861	111	Negatif	-	-
AOÇ 25	14107	15156	1050	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 26	15071	15436	366	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 27	15433	15948	516	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 28	15999	16115	117	Pozitif	-	-
AOÇ 29	16084	16164	81	Pozitif	-	-
AOÇ 30	16261	16139	123	Negatif	-	-
AOÇ 31	16189	16293	105	Pozitif	-	-
AOÇ 32	16397	16290	108	Negatif	-	-
AOÇ 33	16330	16407	78	Pozitif	-	-
AOÇ 34	16588	16749	162	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 35	16852	17049	198	Pozitif	-	-
AOÇ 36	16870	17395	516	Pozitif	"General stress protein"	-
AOÇ 37	17614	17718	105	Pozitif	-	-
AOÇ 38	17735	18260	525	Pozitif	Glikoziltransferaz	DNA metabolizması
AOÇ 39	18340	18417	78	Pozitif	"Phage terminase small subunit"	DNA paketlenmesi
AOÇ 40	18424	18767	1344	Pozitif	"Phage terminase large subunit"	DNA paketlenmesi
AOÇ 41	19778	20227	447	Pozitif	"Phage portal protein"	DNA paketlenmesi



Şekil 2. Sırasıyla insert 1-4 klonlanmış plazmidlerin agaroz jeldeki görüntüleri.

Staphylococcus phage sml kuyruk, DNA paketlenmesi ve baş yapısı, lizis ve DNA metabolizması ile ilgili genler içermektedir. Faj kuyruk genleri içerdiği için, kuyruklu faj grubu olan *Caudovirales* sınıfındandır. *Caudovirales* sınıfı fajları faj popülasyonunun çoğunluğunu oluşturur, ancak viryon yapısı, genom organizasyonu ve replikasyon özellikleri hakkında çok az çalışma vardır. Genom boyutu 18-500 kb arasında değişir. Guanin+Sitozin içeriği, genom yapısının %27-72'sini oluşturur. Çalışmada fajımızın büyüklüğü 20227 bç ve Guanin + Sitozin içeriği %33.96'dır. Bu iki özellik *Caudovirales* için uygundur.

Önceki çalışmalar *Caudovirales* sınıfındaki fajların



Şekil 3. *Staphylococcus phage sml* lizojenik bakteriyofajındaki NCBI programıyla protein karşılığı bulunabilmiş AOC'leri ve kodladıkları proteinleri gösteren gen haritası.

genomlarının kodladığı proteinlerin altı gruba ayrıldığını göstermiştir: lizojeni, DNA metabolizması, DNA paketlenmesi, baş-kuyruk yapısı, lizis ve son olarak virülansla ilişkili genler⁽¹⁵⁾. Fajımızda DNA paketlenmesi ile ilgili üç gen, yani “phage terminase small subunit”, “phage terminase large subunit”, “phage portal protein” belirlenmiştir. Ayrıca “putative membran protein” ve “putative minor structural protein”, baş yapısı ile ilişkili iki proteindir. “Phage tail family protein”, “prophage endopeptidase tail family protein”, “tail fiber protein” ve “phage tail protein” olmak üzere dört tane kuyruk yapısı ile ilişkili gen bulunmuştur. Ayrıca, lizis ile ilişkili olduğu bilinen mannozil-glikoprotein endo-β-N asetilglukozaminidaz, otolizin, “holin” genleri saptanmıştır. Glikoziltransferaz, DNA metabolizmasına bağlı nükleotit biyosentezinde rol oynayan tek proteindir.

TARTIŞMA

Bakteriyofajlar, 1920’lerde Frederick Twort ve Felix d’Herelle tarafından keşfedildikten sonra tedavide kullanılmaya başlanmıştır^(16,17). Önceki çalışmalar, fajların birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanıldığını ve başarılı sonuçların alındığını gösterir. Payne ve ark.⁽¹⁸⁾ *S. aureus* enfeksiyonlarını tedavi etmek için bakteriyofajları kullanmışlardır. Wright ve ark.⁽¹⁹⁾ *Pseudomonas aeruginosa*’nın etken olduğu orta kulak iltihabı enfeksiyonlarını tedavi etmek için faj tedavisini uygulamışlardır. Ayrıca, polimikrobiyal enfeksiyonlarla başa çıkmak için, en yaygın bulaşıcı ajanlara karşı faj karışımları hazırlanmış, ancak faj tedavisi 1930’larda antibiyotiklerin keşfiyle popülaritesini kaybetmiştir.

Son yıllarda, antibiyotiklere direnç gelişimi, bulaşıcı hastalıkların tedavisini zorlaştıran önemli bir sağlık sorununa neden olur. Bilinen tüm antimikrobiyallere dirençli bakteriler ortaya çıktığı için faj tedavisi yeniden gündeme gelmiştir^(20,21). Faj tedavisinde şimdiye kadar litik fajlar kullanılmıştır. Bununla birlikte, litik fajların bakterileri aniden parçalanması sonucunda endotoksinlerin aniden kan dolaşımına salınması istenmeyen sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle, faj tedavisinde, bakterilerin kontrollü olarak parçalanmasını sağlayan lizojenik fajlar tercih edilmelidir. Küçük boyutlu genomu olan lizojenik fajlar, rekombinant fajların hazırlanmasında yarar sağlayacaktır. Tanımladığımız faj 20227 bç büyüklüğünde en küçük fajlardandır. Küçük olması rekombinant olarak fajdan yararlanmada avantaj sağlayacaktır. Fajımızın genomik ve morfolojik özellikleri değerlendirildiğinde genomunun küçük olması, kuyruklu yapıda olması ve genom dizilimi nedeniyle *Caudovirales* sınıfının *Podoviridae* ailesine ait olduğu belirlenmiştir. *Podoviridae* ailesine ait fajlarda kuyruk ve lizis proteinlerini kodlayan genler üst üste gelmekte ve bunları DNA paketlenmesi ile ilgili genler izlemektedir. *Podoviridae* ailesine ait genlerin sıralaması Şekil 4’te verilmiştir. *Caudovirales* fajları, fajların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Fajların evrende oldukça fazla miktarlarda bulunmasına karşılık NCBI veritabanı araştırıldığında şimdiye kadar veritabanına yüklenmiş yalnızca 3601 faj sekansı olduğu görülmüştür. Bunlardan 146’sı stafilokok fajı olup, bu fajların sadece 16 tanesi *Podoviridae* ailesine aittir⁽²²⁾. Fajların çoğunluğu orta büyüklükte genomu olan *Siphoviridae* ailesine aitken, küçük genoma sahip *Podoviridae* ailesi fajların oldukça küçük bir kısmını

oluşturur ve veritabanında şu ana kadar tanımlanmış 16 faj bulunmaktadır. *Staphylococcus* phage sml, şimdiki kadar tanımlanan *Podoviridae* ailesinden 17. faj olmuştur.

Fajda dört adet kuyruk yapısı ile ilgili ("phage tail family protein", "prophage endopeptidase tail family protein", "tail fiber protein" ve "phage tail protein"), üç adet lizis ile ilgili (mannozil-glikoprotein endo- β -N asetilglikozaminidaz, otolizin, "holin"), üç adet DNA paketlenmesi ile ilgili ("phage terminase large subunit", "phage terminase small subunit", "phage portal protein") ve iki adet kapsit yapısı ile ilgili ("putative membran protein" ve "putative minor structural protein") gen tanımlanmıştır. DNA metabolizması ile ilgili yalnızca nükleotit biyosentezinden sorumlu olan glikoziltransferaz proteinine rastlanmıştır. *Staphylococcus* phage sml, sadece mitomisin C ile indüklenerek MRSA'dan ekstrakte edilebildiği için lizojenik bir fajdır. Bununla birlikte, lizojeniye ilişkin genler fajda bulunamamıştır. Bu, veritabanındaki proteinlerle eşleşmeyen AOÇ'lerin ve işlevi bilinmeyen proteinlerin lizojeniye bağlı proteinleri kodlayabildiği ile açıklanabilir. Fajın 41 AOÇ'sinden hiçbirinin veri tabanındaki virülans faktörleriyle eşleşmemiş olması nedeniyle terapide kullanılmasının güvenli olduğu ileri sürülebilir.

AOÇ'lerden 18 tanesi, NCBI BLAST programındaki proteinlerle (%43.9) eşleştiremezken, 6'sı hipotetik protein (%14.6) olarak değerlendirilmiştir. Kwan ve ark.⁽¹⁰⁾ 27 stafilkok fajına ait genomları ve proteinleri inceledikleri araştırmalarında, 2170 AOÇ'den %35'ini proteinlerle eşleştirebilmiş ve %44'ünü ise veritabanındaki herhangi bir genle eşleştirememişlerdir. Ek olarak, *Mycobacterium* ve diğer bakterilerin bakteriyofajları üzerine yapılan başka bir çalışma, faj genomundaki AOÇ'lerin %50-75'ini veritabanındaki proteinlerle eşleştirememiştir⁽¹⁰⁾. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde AOÇ'lerin %43.9'u veri bankasındaki proteinlerle eşleştirememiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, *Podoviridae* ailesine ait yeni bir faj bulunmuş olup, gen ve protein haritası gösterilmiştir. Bu faj, küçük boyutu ve lizojenik özelliği nedeniyle, tedavide kullanılacak rekombinant

faj hazırlanması için uygun olabilecektir. 41 AOÇ'den yalnızca 17'si veri tabanındaki proteinlerle eşleştirebilmiştir. Genlerin rolünü anlamak için daha fazla çalışma yapılmalı ve veri tabanına yüklenmelidir. Faj tedavisi çok umut vericidir, ancak fajların güvenilirliğini araştırarak çalışmalara gereksinim vardır. Genlerin rolleri daha iyi anlaşıldığında, faj terapisi daha güvenli, daha başarılı olabilecek ve daha iyi yönetilebilecektir.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Ankara Üniversitesi, Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu, 25.07.2016 ve 13-621-16 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Ankara University Ethics Committee (07.25.2016 / 13-621-16).

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

KAYNAKLAR

1. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(4):203-18. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
2. Hirai Y, Maebashi K, Yamada K, et al. Characterization of compound A, a novel lincomycin derivative active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot (Tokyo).* 2021;74(2):124-32. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00375-1>
3. Kaur K, Kaur M, Gill AK. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: An emerging problem. *Int J Sci Res.* 2020;8(12):50-2.
4. Harkins CP, Pichon B, Doumith M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol.* 2017;18(1):130. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1252-9>
5. Leitner L, Sybesma W, Chanishvili N, et al. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC Urol.* 2017;17(1):90. <https://doi.org/10.1186/s12894-017-0283-6>
6. Domingo-Calap P, Mora-Quilis L, Sanjuán R. Social

- bacteriophages. *Microorganisms*. 2020;8(4):533. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040533>
7. King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Waltham: Academic Press MA; 2012.
 8. Kurtboke I. *Bacteriophage*. InTechOpen, Australia. 2012. <https://doi.org/10.5772/1065>
 9. Son JS, Lee SJ, Jun SY, et al. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;86(5):1439-49. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2386-9>
 10. Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(14):5174-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501140102>
 11. Vybiral D, Takác M, Loessner M, Witte A, Ahsen U, Bläsi U. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 219(2):275-83. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00028-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00028-4)
 12. Mohan Raj JR, Vittal R, Huilgol P, Bhat U, Karunasagar I. T4-like *Escherichia coli* phages from the environment carry bla CTX-M. *Lett Appl Microbiol*. 2018;67(1):9-14. <https://doi.org/10.1111/lam.12994>
 13. Sahin F, Karasartova D, Özsan TM, Kiyan M, Karahan CZ, Tekeli A. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying an exfoliative toxin A gene encoding phage isolated from a hospitalized patient in Turkey. *Can J Microbiol*. 2013;59(4):260-5. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0721>
 14. Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage ϕ PVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*. 1998; 215(1):57-67. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00278-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00278-9)
 15. Hatfull GF. Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(5):447-53. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>
 16. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2): e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
 17. Chanishvili N. Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res*. 2012; 83:3-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>
 18. Payne RJ, Phil D, Jansen VA. Phage therapy. The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;68(3):225-30. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.109520>
 19. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*. 2009;34(4):349-57. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>
 20. Oliveira H, Sillankorva S, Merabishvili M, Kluskens LD, Azeredo J. Unexploited opportunities for phage therapy. *Front Pharmacol*. 2015;6:180. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00180>
 21. Abedon ST. Commentary: Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Front Microbiol*. 2016;7:1251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01251>
 22. National Center for Biotechnology Information. Complete genomes: Viruses.2020. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?opt=virus&taxid=10239&host=bacteria>]. (Erişim tarihi: 26.12.2020).
 23. Deghorain M, Melderer VL. The staphylococci phage family: An overview. *Viruses*. 2012;4(12):3316-35. <https://doi.org/10.3390/v4123316>

Gram Negatif Bakterilerin ve Steril Süpernatantlarının *Candida albicans* Biyofilmi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Comparison of the Effects of Gram- Negative Bacteria and Their Sterile Supernatants on *Candida albicans* Biofilm

Mayram Hacıoğlu[®], Özlem Oyardı[®]

İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Atif/Cite as: Hacıoğlu M ve Oyardı Ö. Gram negatif bakterilerin ve steril süpernatantlarının *Candida albicans* biyofilmi üzerine etkilerinin karşılaştırılması, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):163-71.

Öz

Amaç: Çeşitli bakteriler ve/veya mantarların bir arada bulunarak oluşturduğu polimikrobiyal biyofilmler, çoğu zaman bu türlerin tek başlarına oluşturdukları monomikrobiyal biyofilmlerden çok daha dirençlidirler. Bu çalışmada, *Candida albicans* biyofilmlerinin *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* veya *Pseudomonas aeruginosa*'nın veya bu bakterilerin süpernatantlarının varlığında nasıl etkilendiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: *C. albicans* SC 5314, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606 ve *P. aeruginosa* PA01 kontrol kökenleri kullanılarak *C. albicans* ile Gram negatif polimikrobiyal biyofilmleri steril mikropatlarda oluşturulmuştur. Hem Gram negatif bakterilerin varlığında hem de steril süpernatantlarının varlığında biyofilm içerisinde değişen *C. albicans* sayısı saptanmıştır.

Bulgular: Sonuçlarımıza göre, çalışılan Gram-negatif bakterilerin tümü biyofilm içerisindeki *C. albicans* hücrelerine antagonist etki göstermiş ve kontrole göre yaklaşık üç log'luk azalma görülmüştür. Steril süpernatantların da *C. albicans* biyofilmi üzerine inhibitör etki gösterdikleri ve maya sayısını en az bir log azalttığı belirlenmiştir. MTT testi ve floresan mikroskopu ile elde edilen görüntüler de bu sonuçları doğrulamıştır.

Sonuç: Pek çok enfeksiyonda ortaya çıkabilen *C. albicans*-Gram negatif polimikrobiyal biyofilmlerde, bakteriler hem hücreleri ile hem de steril hücresiz süpernatantları ile *C. albicans* biyofilm hücrelerini antagonist olarak etkilemiştir.

Anahtar kelimeler: Polimikrobiyal biyofilm, süpernatant, *Candida albicans*

ABSTRACT

Objective: Polymicrobial biofilms consisting of a combination of various bacteria and/or fungi are generally much more resistant than monomicrobial biofilms formed by these species alone. In this study, it was aimed to investigate how *Candida albicans* biofilms were affected in the presence of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* or supernatants of these bacteria.

Method: *C. albicans* with Gram-negative polymicrobial biofilms were formed on sterile microplates by using control strains of *C. albicans* SC 5314, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606 and *P. aeruginosa* PA01. The number of *C. albicans* in biofilms was determined in the presence of both Gram-negative bacteria and sterile supernatants.

Results: According to our results, all Gram negative bacteria displayed an antagonist effect against *C. albicans* in the biofilm and a three log decrease was observed compared to the control. Sterile supernatants were shown to have an inhibitory effect on the *C. albicans* biofilms and reduce the number of yeasts by at least one log. MTT assay and fluorescence microscopy images also confirmed the results.

Conclusion: In *C. albicans*-Gram-negative polymicrobial biofilms that can occur in many infections, bacteria affected *C. albicans* biofilm cells as antagonist agents, both with their cells and sterile cell-free supernatants.

Keywords: Polymicrobial biofilm, supernatant, *Candida albicans*

Alındığı tarih / Received:
20.07.2020 / 20.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:
24.02.2021 / 24.February.2021

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

M. Hacıoğlu 0000-0003-0823-631X
Ö. Oyardı 0000-0001-9992-7225

✉ mayram.tuysuz@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Biyofilm, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışarak oluşturdukları topluluklar olarak tanımlanır ve insanlarda ortaya çıkan enfeksiyonların yaklaşık %65-80'i biyofilm ile ilişkilidir^(1,2). Biyofilmlerde antimikrobiyal maddelere karşı görülen direnç, genellikle antimikrobiyal maddenin biyofilm içine kısıtlı penetrasyonu, çeşitli direnç genlerinin ekspresyonu ve hücrelerin değişen üreme ve metabolik aktiviteleri gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, biyofilm içerisindeki hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelere göre yaklaşık 1.000 kat daha dirençli olabilmektedir^(3,4).

Normal flora elemanları olan *Candida* türleri, yüzeyel enfeksiyonların yanı sıra ciddi sistemik enfeksiyonlar ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar oluşturabilen fırsatçı mikroorganizmalardır. Biyofilm üretimi hem *Candida albicans* hem de non-albicans *Candida*'lar için en önemli virülans faktörlerinden biridir ve antifungal direnç ile de ilişkilidir⁽⁵⁾. Hem ülkemizde hem de dünyada yapılan çalışmalarda non-albicans *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun *C. albicans*'a göre daha fazla olduğu gösterilmiştir⁽⁶⁻⁸⁾. Ancak, nozokomiyal kan enfeksiyonları arasında dördüncü sırada yer alan kandidemiler de dâhil olmak üzere günümüzde tüm kandidozlarda hala en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır⁽⁹⁾. *C. albicans* biyofilmleri, maya hücreleri, yalancı hif ve gerçek hifler tarafından oluşturulmuş hücre dışı polimerik matriksten meydana gelen karmaşık bir sistemdir. *C. albicans* biyofilmleri oluşurken, biyofilm içerisindeki maya hücrelerinin yanı sıra psödohif ve hif oluşumu yani filamentasyonda da artış gözlenir⁽¹⁰⁾. Non-albicans *Candida* türlerinin çoğu ise bu filamentasyon kabiliyetinden yoksundur ve tamamı maya hücrelerinden meydana gelen topluluklar oluşturur. Ancak, tüm *Candida* türleri tarafından oluşturulan biyofilmler, hücre dışı polimerik matriksten meydana gelmektedirler^(11,12). Hem yapışmayı sağlayan hem de antifungal ve konak savunmalarına karşı dirence neden olan bu hücre dışı polimerik matriks, protein (%55), karbonhidrat (%25), lipid (%15) ve DNA (%5)'dan meydana gelmektedir⁽¹⁰⁾.

Çeşitli bakteriler ve/veya mantarların bir arada bulunarak oluşturduğu polimikrobiyal biyofilmler ise çoğu zaman bu türlerin tek başlarına oluşturdukları monomikrobiyal biyofilmlerden çok daha dirençlidirler. Polimikrobiyal biyofilmler, mikrobiyal ya da konak kaynaklı polisakaritlerden oluşan matriks içerisine gömülü, virüs, bakteri, mantar veya parazit gibi çeşitli mikroorganizmaların bir arada bulunması ile meydana gelen karmaşık hücre topluluklarıdır ve zaman zaman hastane enfeksiyonları etkenlerinin de içinde bulunduğu dirençli mikroorganizmalar da polimikrobiyal biyofilmlere katılabilmektedirler^(5,13,14). Yapılan çalışmalar, birden fazla mikroorganizma tarafından oluşturulan bu polimikrobiyal biyofilmlerdeki mantarların antibakteriyel ilaçların aktivitesini, bakterilerin ise antifungal ilaçların aktivitesini değiştirebildiklerini göstermiştir⁽¹⁵⁾. Bakteriler ve *C. albicans*'ın aynı habitat içerisinde yaşamaları mutualistik, sinerjistik veya antogonistik etki yaratabilmektedir^(16,17).

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* antimikrobiyal ajanlara geliştirdikleri direnç nedeniyle; pnömoni, sistemik enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, menenjit veya nozokomiyal enfeksiyonlar gibi tedavisi oldukça güç enfeksiyonlara neden olabilen Gram negatif çomaklardır⁽¹⁸⁾. Oluşturdukları biyofilmler ile kistik fibrozis enfeksiyonlarına veya kontakt lens, üriner ve santral venöz kateterler, endotrakeal tüpler gibi yabancı cisimlere yapışarak hayati öneme sahip enfeksiyonlara neden olabilirler⁽¹⁹⁾. Bu bakteriler aynı zamanda kateter gibi yabancı cisimler üzerinde ve gastrointestinal sistem, peritonit, kistik fibrozis ve yanık ve yaralarda *C. albicans* ile polimikrobiyal biyofilmler de oluşturabilirler⁽¹⁴⁾.

Nozokomiyal *C. albicans* enfeksiyonlarının %26-57'sini oluşturan ve polimikrobiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında da %70'in üzerinde tedavi başarısızlığına neden olabilen fungal/bakteriyel polimikrobiyal biyofilmlerine karşı antimikrobiyal ajanların çoğu zaman etkisiz kalabildikleri gösterilmiştir^(5,14,20). Ancak buna rağmen yapılan literatür araştırmasına göre bu polimikrobiyal biyofilmler ile ilgili yapılan çalışmaların monomikrobiyal biyofilm çalışmalarına göre daha az oldukları görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamızda,

C. albicans + *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* veya *P. aeruginosa*'nın varlığında oluşturulan fungal/bakteriyel polimikrobiyal biyofilmlerin etkileşimleri, dolayısıyla bakterilerin veya yalnızca hücresiz süpernatantların *C. albicans* biyofilmi üzerine etkilerinin karşılaştırılarak değerlendirilmesi ve bu polimikrobiyal biyofilmler içerisindeki farklı türler arasında olan etkileşimlerin anlaşılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, *C. albicans* SC 5314, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606 ve *P. aeruginosa* PA01 kontrol kökenleri kullanılmıştır.

Biyofilm oluşumu: Bir gecelik taze maya ve bakteri kültürleri, sırasıyla yeast nitrogen base broth (YNB-Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, ABD) ve tryptic soy broth (TSB, Difco Sparks, MD, ABD) besiyerleri içinde 37°C'de bir gece yatay çalkalayıcıda (75 rpm) inkübe edilmiştir. Kültürler steril fosfat tamponunda iki kez yıkanmış (3.000 rpm, 5-10 dakika), spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve %0.2 glukoz içeren TSB (TSB-g) içerisinde son inokulum konsantrasyonu 1×10^7 koloni oluşturan birim (kob)/ml'ye ayarlanmıştır. *C. albicans* ve Gram negatif bakteriler 1:1 oranında dış ortamda karıştırılarak polimikrobiyal süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu süspansiyonlardan 100'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarına eklenmiş ve polimikrobiyal biyofilmler (*C. albicans* + *E. coli*, *K. pneumoniae* *A. baumannii* veya *P. aeruginosa*) oluşturulmuştur. Yalnızca *C. albicans* ve sadece bakterilerin bulunduğu kontrol kuyuları da eklenerek plaklar 37°C'de inkübe edilmiştir. Dört saat sonra plaklardaki besiyeri dışarı atılarak her kuyu 100'er µl fosfat tamponu ile yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla 3 kez yıkanmıştır. Taze besiyeri eklendikten sonra, plaklar 20 saat daha inkübasyona kaldırılmıştır^(21,22).

Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *Candida albicans* sayısının belirlenmesi: Inkübasyon sonrası kuyulardaki besiyeri dışarı atılarak, yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla her kuyu 100'er µl fosfat tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Biyofilm içerisindeki canlı

mikroorganizma sayısını saptamak amacıyla kuyulardaki biyofilmler ikişer kez ultrasonik su banyosu içerisinde sonikasyon (5 dakika) ve mikroplak çalkalayıcı ile vorteks (900 rpm) işlemlerinden geçirilmiştir. Çalkalayıcıda homojenize olan biyofilm solüsyonu steril tüplere aktarılarak fosfat tamponu içerisinde seri dilüsyonları yapılmış ve *C. albicans* sayımı için CHROMagar *Candida* besiyeri kullanılmıştır. 37°C'de bir gece inkübasyon sonrası koloniler sayılarak ve seyreltme faktörü de hesaba katılarak kob/ml sayıları belirlenmiştir. Tüm deneyler üç kez yinelenmiştir^(21,23).

Süpernatantların hazırlanması: Hazırlanışı yukarıda belirtildiği şekilde bakteri biyofilmleri oluşturulmuş ve biyofilm tabakasına dokunmadan üst sıvılar steril tüplere ayrı ayrı toplanmıştır. Tüpler, 5.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve 0.2 µM'lık enjektör ucu filtre ile süzülerek hücresiz steril süpernatantlar elde edilmiştir⁽²³⁾.

Süpernatantların *Candida. albicans* biyofilmi üzerine etkilerinin belirlenmesi: Gram negatif bakterilerin süpernatantlarından 100'er µl alınarak *C. albicans* biyofilmlerini içeren kuyulara aktarılmış ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası plaklar ikişer kez ultrasonik su banyosu içerisinde sonikasyon (5 dakika k) ve mikroplak çalkalayıcı ile vorteks (900 rpm) işlemlerinden geçirilmiştir. Bu işlemlerden sonra biyofilm solüsyonu steril tüplere aktararak fosfat tamponu içerisinde seri dilüsyonları yapılmış ve hücrelerin sayımı için Triptik Soy Agar (TSA, Difco Sparks) besiyerine ekilmiştir. 37°C'de bir gece inkübasyon sonrası koloniler sayılarak ve seyreltme faktörü de hesaba katılarak kob/ml sayıları belirlenmiştir. Tüm deneyler üç kez yinelenmiştir⁽²³⁾.

MTT yöntemi ile biyofilm içerisindeki mikroorganizma canlılığının belirlenmesi: *C. albicans*'ın bakterilerle veya hücre içermeyen steril bakteriyel süpernatantlarla birlikte 96 kuyulu steril mikroplak içerisinde biyofilmi oluşturulmuştur. Tek başına *C. albicans* içeren kuyular da çalışmaya eklenmiştir. Oluşan biyofilmlerdeki mikroorganizma canlılığı MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) kolorimetrik yöntemi ile test edilmiştir. MTT yöntemi

mi, canlı mikroorganizmaların redüktazlarının bir tetrazolyum tuzu olan MTT'yi çözünemeyen formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Biyofilm oluşumundan sonra kuyulardaki süspan-siyon uzaklaştırılmış ve 0.5 mg/ml MTT solüsyonu içeren taze besiyerinden her bir kuyuya eklenmiştir. 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristallerini çözmek için 150 µl DMSO her bir kuyuya eklenmiştir. Optik yoğunluk, mikropalak okuyucu (EON-BioTEK Instruments, Winooski, VT, ABD) kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Yüzde canlılık *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm ile karşılaştırılarak belirlenmiştir⁽²⁴⁾.

Floresan mikroskopu ile biyofilm kütlesinin analizi: Polimikrobiyal biyofilmlerdeki ve hücre içermeyen steril süpernatantlar ile muamele edilmiş *C. albicans* biyofilmlerindeki canlı/ölü mikroorganizma varlığı, akrinin oranj (Invitrogen, Carlsbad, California, ABD) ve propidyum iyodür (Invitrogen, Carlsbad, California, ABD) boyaları kullanılarak floresan mikroskopu ile incelenmiştir. Bir ml fosfat tamponu içerisine 1 µl akrinin oranj (5 mg/ml) ve 1 µl propidyum iyodür (3 µg/ml) konularak floresan çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında oluşturulan biyofilm örneklerinin üzerine 200 µl hazırlanan bu floresan solüsyonu eklenmiştir. Mikropalak ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanmış ve oda ısısında 20-30 dakika bekletilmiştir. Kuyular fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla bir kez fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Akrinin oranj canlı hücreleri boyayarak yeşil renkli floresan açığa çıkarırken, propidyum iyodür hücre membranları hasar görmüş ölü hücreleri kırmızı renkte boyamaktadır. Böylelikle canlı hücreler yeşil renkli, ölü hücreler ise kırmızı renkli görülmektedir. Biyofilmler, Olympus BX51 floresan mikroskopu, Olympus DP72 kamera ve DP2-TWA1 yazılımı kullanılarak görüntülenmiştir⁽²⁵⁾.

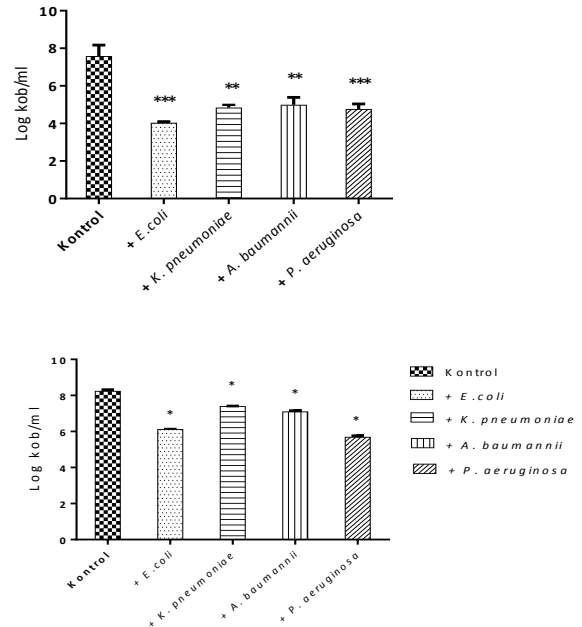
İstatistik: Çalışmada elde edilen veriler, bilgisayar ortamına aktarılarak GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) ile değerlendirilmiştir. Tüm deneyler ayrı ayrı üç kez yinelenip sonuçların ortalaması alınarak standart sapmaları saptanmıştır. One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve

post-hoc test olarak ise Bonferroni's Multiple Comparison testi kullanılarak *p* değeri <0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

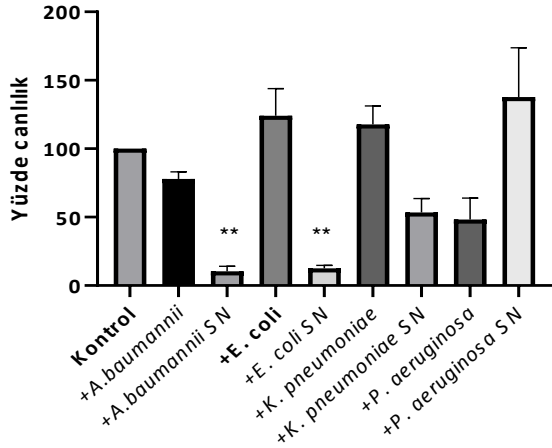
BULGULAR

Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *Candida albicans* sayısı: Gram negatif bakterilerin ve *C. albicans*'ın polimikrobiyal biyofilmleri mikropalalarda oluşturulmuş ve *C. albicans* hücrelerinin sayısı koloni sayımı ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, çalışılan tüm Gram negatif bakteriler *C. albicans* biyofilmlerini antagonist etkilemiş ve kontrole göre hücre sayılarında yaklaşık 3 log'luk düşüş gözlenmiştir (Şekil 1a).

Süpernatantların *Candida albicans* biyofilmi üzerine etkileri: Olgun *C. albicans* biyofilm hücrelerine Gram negatif bakterilerin steril süpernatantları eklendikten sonra maya hücrelerinin sayısı koloni sayımı ile tespit edilmiştir. *E. coli* ve *P. aeruginosa* süpernatantlarının *C. albicans* biyofilm hücrelerinin sayısını 2 log'dan daha fazla, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* süpernatantlarının ise yaklaşık 1 log azalttığı saptanmıştır (Şekil 1b).



Şekil 1. Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *C. albicans* sayısı. a) *C. albicans*'ın Gram negatif bakterilerle bir arada bulunduğu biyofilmlerdeki sayısı b) *C. albicans*'ın steril süpernatantlar ile bir arada bulunduğu biyofilmlerdeki sayısı *İstatistiksel olarak anlamlı (*p* değeri < 0.05).



Şekil 2. *Candida albicans*'ın tek başına (kontrol), bakteriler ve hücre içermeyen steril süpernatantlarla birlikte oluşturduğu biyofilm canlılık yüzdesi ** İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$). SN: süpernatant

Biyofilmlerdeki mikroorganizma canlılığı: Gram negatif bakterilerin *C. albicans* ile oluşturduğu biyofilmdeki canlı hücre yüzdesi *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilmdeki canlı hücre yüzdesinden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Bakteriye süpernatantların *C. albicans* biyofilm oluşumuna olan etkileri incelendiğinde, özellikle *E. coli* ve *A. baumannii* süpernatantlarının *C. albicans* biyofilm oluşumunu ciddi oranlarda inhibe ettiği görülmektedir. *K. pneumoniae* süpernatantı ise *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilme göre yaklaşık %50 daha az biyofilm oluşumuna neden olmuştur. Diğer bakterilerden farklı olarak *P. aeruginosa*, *C. albicans*'ın biyofilm oluşumunu hücre içermeyen süpernatantın daha yüksek oranda inhibe etmiştir.

Floresan mikroskopu görüntüleri: Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *C. albicans* kütlelerinin azlığı, buna karşın bakteriyel popülasyonun daha fazla olduğu floresan mikroskopu görüntüleri ile gösterilmiştir. *C. albicans* biyofilmleri hücre içermeyen steril süpernatantlarla muamele edildikten sonra, akridin oranj ve propidyum iyodür ile boyandığında, canlı hücreler yeşil renkte, ölü hücreler ise kırmızı renkte boyanmıştır.

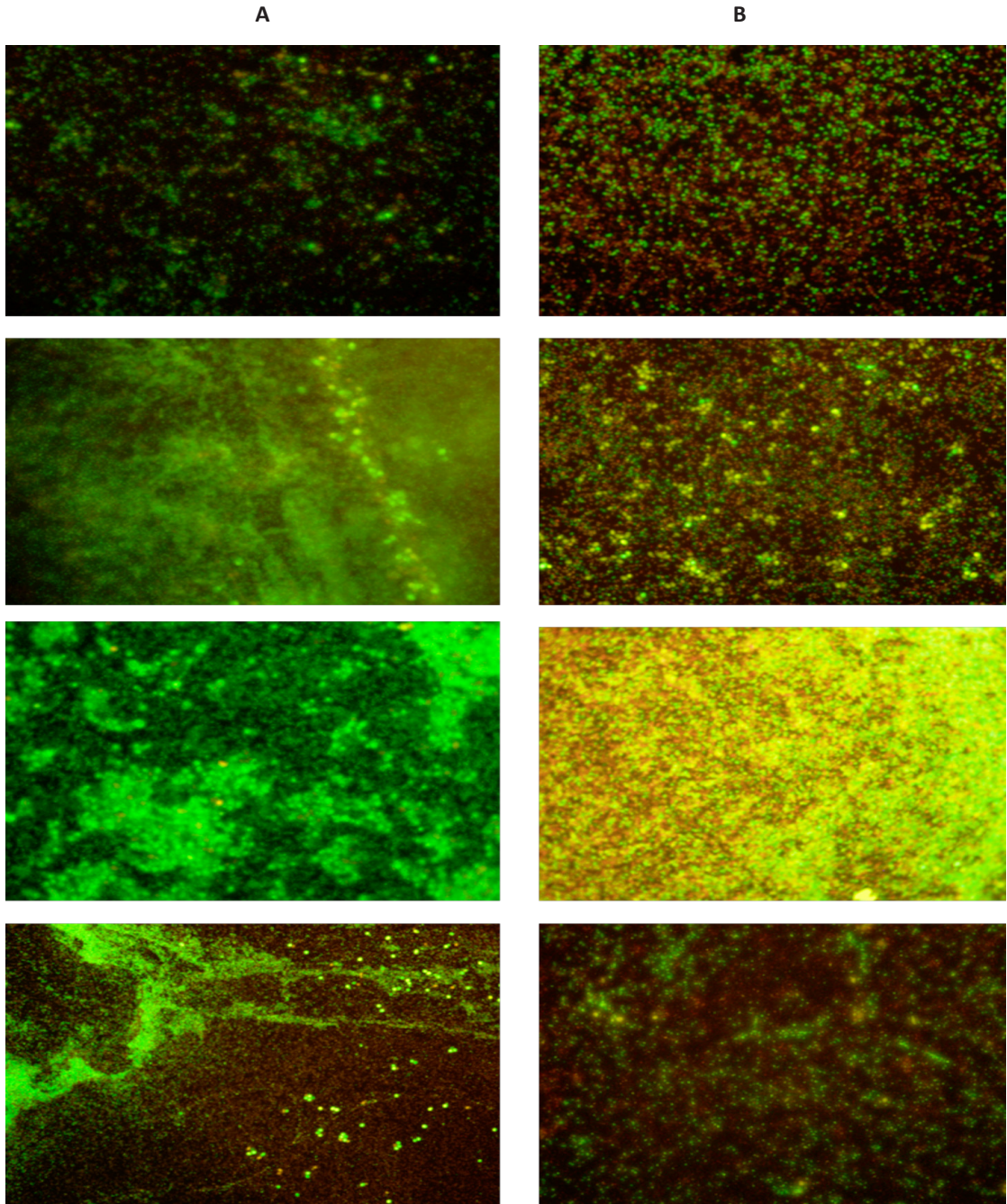
TARTIŞMA

İnvaziv mantar enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıra-

da yer alan *Candida* türleri, nozokomiyal kan dolaşımını enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilebilmektedir ve tüm nozokomiyal patojenler arasında da en yüksek mortalite oranına (yaklaşık %47) sahip olan mikroorganizmalardır⁽²⁶⁾. Mikroorganizmaların birbirlerine veya kalıcı vasküler kateterler gibi tıbbi cihazlara yapışarak oluşturdukları biyofilmler içerisindeki mantar hücreleri, antifungal tedavilere direnç gösterdikleri gibi konak savunmasını da bozabilirler. Bu biyofilmler zaman zaman heterojen bir yapı göstererek bakterilerle birlikte polimikrobiyal biyofilmler şeklinde de oluşabilmektedir⁽⁵⁾.

Bu amaçla çalışmamızda, kistik fibrozis başta olmak üzere çeşitli sistemik enfeksiyonlar, vajinal enfeksiyonlar, oral enfeksiyonlar, gastrointestinal enfeksiyonlar, deri ve yara enfeksiyonlarında polimikrobiyal biyofilmler oluşturabilen *C. albicans* ve *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* veya *P. aeruginosa* bakterilerinin birlikte oluşturdukları biyofilmler incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre, çalışılan Gram negatif bakterilerin tümü biyofilm içerisindeki *C. albicans* hücrelerini istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$) şekilde inhibe etmiş ve antagonist etki göstermiştir. En yüksek antagonist etkiye neden olan bakteri *E. coli* olarak belirlenmiştir. *E. coli*- *C. albicans* polimikrobiyal biyofilmlerindeki *C. albicans* sayısı kontrol grubuna göre üç log azalma göstermiştir. Diğer Gram negatif bakteriler de benzer şekilde *C. albicans*'ın polimikrobiyal biyofilmlerdeki varlığını yaklaşık iki log azaltmışlardır. Gram negatif bakterilerin *C. albicans* biyofilm oluşumu üzerine antagonist etkileri olması ve polimikrobiyal biyofilmlerdeki *C. albicans* sayısını azaltmalarına rağmen, MTT sonuçlarına göre tüm polimikrobiyal biyofilmlerdeki toplam canlı hücre sayısı istatistiksel olarak azalmamıştır. Floresan mikroskopu görüntüleri de polimikrobiyal biyofilmlerdeki Gram negatif bakteri varlığının fazlalığını doğrulamaktadır.

Candida albicans Gram negatif bakterilerle birlikte değil, Gram negatif bakterilerin biyofilmlerinden elde edilen hücresiz süpernatantlar ile birlikte inkübe edildiğinde ise biyofilmdeki *C. albicans* sayısı daha az etkilenmiştir. Gram negatif hücrelerin varlığı *C. albicans*'ın biyofilm içerisinde tutunmasını yüksek



Şekil 3. Floresan görüntüleri. A: Polimikrobiyal biyofilmler B: Bakteriye süpernatantların *C. albicans* üzerine etkileri. Görüntüler sırası ile; *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*. AO/PI kullanılarak canlı hücreler yeşil ve ölü hücrelerde kırmızı ile boyanmıştır (büyütme $\times 40$, ölçü = 20 μm).

oranda etkilerken, bu etkinin bir kısmından Gram negatif bakterilerin biyofilm ortamına salgıladıkları maddelerin, bir kısmından ise bakteri hücrelerinin fiziksel varlığının sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Çalışılan tüm bakterilerin süpernatantları, *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilme göre

biyofilm içerisindeki *C. albicans* sayısını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır. En fazla inhibitör etki gösteren süpernatantlar *E. coli* ve *P. aeruginosa* süpernatantları olarak belirlenmişlerdir (iki log azaltma). *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* süpernatantları ise yaklaşık bir log'luk azalmaya neden olmuşlardır.

Süpernatantların gözlenen etkileri, *C. albicans*'ın katı yüzeylere yapışmasının veya biyofilm oluşumu ve gelişiminin hasar görmesinin bir sonucu olabileceğini düşündürmüştür.

Koloni sayım sonuçları, MTT sonuçları ile karşılaştırıldığında ise *P. aeruginosa* süpernatantı hariç tüm süpernatantların benzer sonuçlarla *C. albicans*'ın biyofilmdeki canlılık yüzdesini azalttıkları gözlenmiştir. *E. coli* süpernatantı *C. albicans* biyofilmlerindeki canlılık yüzdesini kontrol grubuna kıyasla %12.6'ya kadar düşürmüştür. *C. albicans* biyofilmindeki canlılık yüzdesini en çok etkileyen süpernatant ise *A. baumannii* süpernatantı olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre %90'a yakın bir oranda biyofilmdeki *C. albicans* canlılığını azaltmıştır.

Pseudomonas aeruginosa süpernatantı ise *C. albicans* biyofilm oluşumuna karşı etkisiz kalmış ve oluşan biyofilm kütlesini değiştirememiştir. Sonuçlarımızdan farklı olarak, Holcombe ve ark.⁽²⁷⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* süpernatantı biyofilm oluşumun ilk basamağından itibaren ortamda bulunduğu *C. albicans* biyofilm oluşumunun inhibe olduğu, fakat adezyon aşamasından (1 saat) sonra ortamdan uzaklaştırılan süpernatantın etkisiz olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde adezyon aşamasından sonra ortama konulan süpernatantın ise biyofilm oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Araştırmacılar tarafından elde edilen bu sonuçlar, süpernatantların biyofilmin hangi aşamasında ilave edildiğine ve ne kadar süre ile etkili olduklarına göre biyofilm üzerine olan etkilerinin değiştiğini göstermiştir.

Kistik fibrozis hastalarının akciğerleri ve ciddi yanık yaralarında sıklıkla bir arada bulunabilen *C. albicans* ve *P. aeruginosa*'nın birbirleri ile karmaşık ilişki içerisinde oldukları bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, *Pseudomonas*'ın quorum sensing sinyal molekülü olan 3-oxo-C12-homoserin laktonun *Candida* morfolojisini ve fungal metabolit olan farnesolün de *Pseudomonas*'ı antagonist olarak etkilediği gösterilmiştir^(28,29).

Peleg ve ark.⁽³⁰⁾ tarafından yapılan başka bir çalışmada da yine benzer şekilde *A. baumannii*'nin *C. albicans*

hif oluşumunu dolayısıyla biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. Benade ve ark.⁽³¹⁾ tarafından yapılan bir araştırmada, aralarında *K. pneumoniae*'nin de bulunduğu çeşitli bakterilerin aerobik koşullarda *C. albicans*'ın üremesini inhibe ettiği saptanmıştır. Genellikle üriner sistem enfeksiyonlarında bir arada bulunan *E. coli*'nin ise, *C. albicans*'ın mesane mukozasına yapışmasını arttırdığı gösterilmiştir^(17,32). Elde ettiğimiz sonuçlarımızın daha önce yapılan çalışmalar ile *E. coli* hariç uyum gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızda, *E. coli*'nin de diğer Gram negatif bakteriler gibi *C. albicans* biyofilm hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiş bu durum farklı suşların farklı sonuçlar gösterebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Floresan görüntüleme sonuçlarına göre de süpernatantların *C. albicans* biyofilmindeki canlı hücre sayısını azalttığı, biyofilm içerisindeki kırmızı renkli ölü hücrelere bakarak anlaşılmalıdır.

Çeşitli kültürlerden elde edilen hücresiz steril süpernatantların, elde edildikleri mikroorganizmaya bağlı olarak değişmekle birlikte bakteriyosin, hidrojen peroksit veya organik asitler gibi çeşitli biyolojik aktif maddeler içerebildikleri ve bu maddelerin de başka mikroorganizmalar için antimikrobiyal etki gösterebileceği bilinmektedir⁽³³⁾. Yapılan bir çalışmada, *E. coli*'nin süpernatantının aralarında *C. albicans*'ın da bulunduğu altı farklı *Candida* türünün biyofilmi üzerine etkisi araştırılmış ve *E. coli*'nin salgıladığı maddelerin *Candida*'ların biyofilm oluşumu için gerekli olan hif oluşum genlerinin ekspresyonunu engellediği böylece biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir⁽³⁴⁾. Çalışmamızda, Gram negatif bakterilerden elde ettiğimiz steril süpernatantların *C. albicans* biyofilmi üzerine inhibitör etki gösterdikleri ve maya sayısını en az bir log azalttıkları gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre, bakteri hücrelerinin maya hücreleri ile bir arada bulunduğu biyofilmlerde, yalnızca süpernatantlarının bulunduğu biyofilmlere göre *C. albicans* sayısının daha fazla azaldığı belirlenmiş ve bu durum da bakteriyel/fungal biyofilmlerde yalnızca süpernatant içerisindeki biyolojik aktif maddelerin değil aynı zamanda bakteri hücrelerinin de antimikrobiyal etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Dimorfik bir maya olan *C. albicans* değişen ortam koşullarında mayadan hife dönüşerek biyofilm oluşturmaya başlamaktadır⁽³⁴⁾. *C. albicans* biyofilmleri, maya hücreleri, yalancı hif ve gerçek hiflerden meydana gelen karmaşık bir sistemdir ve zaman zaman çeşitli bakterilerle birlikte polimikrobiyal biyofilmler oluşturabilir^(16,17). Yapılan çalışmalar nozokomiyal *C. albicans* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğunun polimikrobiyal enfeksiyonlar olduğunu göstermiş, ancak buna rağmen fungal-bakteriyel biyofilmlerle ilgili yapılan çalışmaların monomikrobiyal biyofilm çalışmalarına göre daha az oldukları görülmüştür⁽¹⁴⁾. Bu nedenle çalışmamızın polimikrobiyal biyofilmlerin doğasını anlamaya ve bu biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonlarla mücadelede terapötik stratejilerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre; sistemik enfeksiyonlar, vajinal enfeksiyonlar, deri ve yara enfeksiyonları, oral enfeksiyonlar, gastrointestinal enfeksiyonlar ve kistik fibrozis gibi pek çok enfeksiyonda ortaya çıkabilen *C. albicans* Gram negatif polimikrobiyal biyofilmlerde bakteriler hem hücreleri ile hem de steril hücresiz süpernatantları ile *C. albicans* biyofilm hücrelerini antagonist olarak etkilemiştir.

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

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSA-2017-26191 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

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

Funding: Istanbul University Scientific Research Projects Unit (Project No. TSA-2017-26191).

KAYNAKLAR

- Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. PLoS Pathog. 2012;8(4):e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>
- Macià MD, Del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018;36(6):375-81. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.04.006>
- Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. Future Microbiol. 2012;7(9):1061-72. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
- Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. Mycoses. 2012;55(3):199-204. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x>
- Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. Crit Rev Microbiol. 2021;47(1):91-111. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
- Lahkar V, Saikia L, Patgiri SJ, Nath R, Das PP. Estimation of biofilm, proteinase & phospholipase production of the *Candida* species isolated from the oropharyngeal samples in HIV-infected patients. Indian J Med Res. 2017;145(5):635-40. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1773_14
- Hacioglu M, Guzel CB, Savage PB, Tan ASB. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. Med Mycol. 2019;57(3):291-9. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy023>
- Tüzüner U, İnci R. *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun modifiye mikroplak ve modifiye XTT redüksiyon yöntemleri ile saptanması. Ege Tıp Derg. 2017;56(4):178-82. <https://doi.org/10.19161/etd.395217>
- Jahagirdar VL, Davane MS, Aradhya SC, Nagoba BS. *Candida* species as potential nosocomial pathogens- A review. Electron J Gen Med. 2018;15(2):em05. <https://doi.org/10.29333/ejgm/82346>
- Nett JE, Andes DR. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. J Fungi (Basel). 2020;6(1):21. <https://doi.org/10.3390/jof6010021>
- Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: Quantification, structure and matrix composition. Med Mycol. 2009;47:681-9. <https://doi.org/10.3109/13693780802549594>
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):288-305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):193-213. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-11>
- Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends Microbiol. 2011;19(11):557-63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.004>

15. Alam F, Catlow D, Di Maio A, Blair JMA, Hall RA. *Candida albicans* enhances meropenem tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in a dual-species biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(4):925-35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz514>
16. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):42-8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.001>
17. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;299(1):1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x>
18. CDC. Gram-negative bacteria infections in healthcare settings. Centers for Disease Control and Prevention. [<https://www.cdc.gov/hai/organisms/gram-negative-bacteria.html>]. (Erişim tarihi: 10/06/2020).
19. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Topics.* 2012;22(1):2-16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
20. Qu Y, Locock K, Verma-Gaur J, Hay ID, Meagher L, Traven A. Searching for new strategies against polymicrobial biofilm infections: guanlylated polymethacrylates kill mixed fungal/bacterial biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(2):413-21. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv334>
21. Hacıoğlu M, Oyardı O, Bozkurt-Guzel C, Savage PB. Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms. *J Antibiot (Tokyo).* 2020;73(7):455-62. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0299-0>
22. Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):74-82. <https://doi.org/10.1128/AAC.01599-12>
23. Tavernier S, Crabbé A, Hacıoğlu M, et al. Community composition determines activity of antibiotics against multispecies biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9):e00302-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00302-17>
24. Kairo SK, Bedwell J, Tyler PC, Carter A, Corbel MJ. Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine.* 1999;17(19):2423-38. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00023-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00023-7)
25. Peyyala R, Kirakodu SS, Ebersole JL, Novak KF. Novel model for multispecies biofilms that uses rigid gas-permeable lenses. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(10):3413-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00039-11>
26. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4):e1-50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
27. Holcombe LJ, McAlester G, Munro CA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. *Microbiology.* 2010;156(5):1476-86. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037549-0>
28. McAlester G, O'Gara F, Morrissey JP. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt5):563-69. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47705-0>
29. Keçeli Özcan S, Dündar D, Sönmez Tamer G. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antikandidal aktiviteleri ve in vitro *Candida* biyofilm oluşumunun inhibisyonu. *Mikrobiyol Bul.* 2012;46(1):39-46.
30. Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Mylonakis E. Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(38):14585-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805048105>
31. Benadé E, Stone W, Mouton M, Postma F, Wilsenach J, Botha A. Binary interactions of antagonistic bacteria with *Candida albicans* under aerobic and anaerobic conditions. *Microb Ecol.* 2016;71(3):645-59. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0706-4>
32. Levison E, Pitsakis G. Susceptibility to experimental *Candida albicans* urinary tract infection in the rat. *J Infect Dis.* 1987;155(5):841-6. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.5.841>
33. Frickmann H, Klenk C, Warnke P, Redanz S, Podbielski A. Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of Staphylococci. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2018;8(4):119-27. <https://doi.org/10.1556/1886.2018.00022>
34. Bandara HM, Cheung BP, Watt RM, Jin LJ, Samaranyake LP. Secretory products of *Escherichia coli* biofilm modulate *Candida* biofilm formation and hyphal development. *J Investig Clin Dent.* 2013;4(3):186-99. <https://doi.org/10.1111/jicd.12048>

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının İlk Sıra Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıkları

Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates to First-line Antituberculosis Drugs at Dokuz Eylül University Hospital

Nazlı Arslan*[Ⓜ], Müge Hacer Özkarataş**[Ⓜ], Nuran Esen**[Ⓜ], Aydan Özkütük**[Ⓜ]

*Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

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

Atf/Cite as: Arslan N, Özkarataş MH, Esen N, Özkütük A. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının ilk sıra antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):172-9.

Öz

Amaç: Tüberküloz dünyada 10 milyon insanı etkileyen ve 1.5 milyon insanın tek başına ölümüne neden olan enfeksiyon hastalığı olması ile hâlen önemini korumaktadır. Tüberkülozun eliminasyonu ve kontrolünde en büyük engel dirençli tüberküloz olguların ortaya çıkması ve yayılmasıdır. Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı/Mikobakteriyoloji biriminde güncel *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve antitüberküloz duyarlılık durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda, Ocak 2013-Kasım 2019 yılları arasında gönderilmiş tüm örneklerin sonuçları *M. tuberculosis* kompleks varlığı ve ilaç duyarlılık sonuçları açısından retrospektif olarak incelenmiştir. Örneklerin Löwenstein Jensen ve BACTEC MGIT 960 sisteminde kültürü yapılmıştır. İlaç duyarlılık testi BACTEC MGIT 960 SIRE kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, 2.1620 örnekten 473 (%2.2)'ünde *M. tuberculosis* kompleks üremesi olmuştur. Örneklerin 300 (%63.4)'ü akciğer, 173 (%36.6)'ü akciğer dışı olarak sınıflandırılmıştır. Aynı hastaya ait yineleyen örnekler çıkartıldığında toplam 365 hastaya ait pozitiflik belirlenmiştir ve 321 (%88.2)'inin duyarlılık sonucu çıkmıştır. Bunlar içinde 275 (%85.7)'i primer ilaçların tümüne duyarlı saptanmıştır. Toplam streptomisin, izoniyazid, rifampisin ve etambutol direnç oranları ise sırasıyla, %7.5 (24 hasta), %6.8 (22 hasta), %2.2 (7 hasta) ve %0.6 (2 hasta) olarak bulunmuştur. Çok ilaca direnç oranı ise %0.6 (2 hasta) olarak saptanmıştır.

Sonuç: Hastanemizde en yüksek direnç oranına sahip olan birinci seçene antitüberküloz ilacın streptomisin olduğu görülmüştür. Tüm ilaçlara ait direnç oranları Türkiye Verem Savaş Raporu'na ve Türkiye'deki diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Bu düşük oranların korunması ve tüberküloz yönetimi için ilaç surveians programının uygulanması önemli rol oynamaktadır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, antitüberküloz ilaç duyarlılığı, ilk sıra ilaçlar

ABSTRACT

Objective: Tuberculosis retains its importance as the only infectious disease in the world that affects 10 million people and causes 1.5 million deaths per se. The major obstacle in the elimination and control of tuberculosis is the emergence and spread of resistant tuberculosis cases. It was aimed to determine the current *Mycobacterium tuberculosis* complex and its susceptibility to antituberculosis drugs at Dokuz Eylül University Hospital.

Method: In our study, the results of all samples sent between January 2013 and November 2019 were examined retrospectively for the presence of *M. tuberculosis* complex and drug susceptibility results. The samples were cultured in Löwenstein Jensen media and BACTEC MGIT 960 system. Drug susceptibility testing was performed with the BACTEC MGIT 960 SIRE kit in accordance with the recommendations of the manufacturer.

Results: In a total of 473 (2.2%) of 21620 specimens *M. tuberculosis* complex was reproduced. The samples were classified as pulmonary (n:300; 63.4%) and extrapulmonary (n:173; 36.6%), samples. When repeated samples of the same patient, were excluded, positive culture test results were determined in a total of 365 patients. Susceptibility to all primary antituberculosis drugs was shown in 275 of 321 (85.7%) patients, while total rates of resistance to streptomycin, isoniazid, rifampicin and ethambutol were found in respective number of patients as follows: (n:24 (7.5%), 22 (6.8%), (n:7; 2.2%) and (n:2; 0.6%). The rate of MDR was 0.6% in 2 patients.

Conclusion: In our hospital, streptomycin is the first-line antituberculosis drug with the highest resistance rate. All susceptibility rates were seen lower than the data reported in Turkey Tuberculosis Control Report and other studies of Turkey. Implementing drug surveillance program plays an important role for maintaining these low rates and for the management of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, first line drugs, antituberculosis drug susceptibility

Alındığı tarih / Received:
27.12.2019 / 27.December.2019

Kabul tarihi / Accepted:
03.03.2021 / 03.March.2021

Yayın tarihi / Publication date:
31.06.2021 / 31.June.2021

ORCID Kayıtları

N. Arslan 0000-0002-5782-9288
M. H. Özkarataş 0000-0001-8897-0121
N. Esen 0000-0001-9796-3003
A. Özkütük 0000-0002-1710-2287

✉ nzlarslan88@gmail.com

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in yol açtığı, çoğunlukla akciğerler olmak üzere, tüm sistemleri etkileyebilen kronik bir granüloamatöz enfeksiyon hastalığıdır⁽¹⁾. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, 1993 yılında küresel bir sağlık tehdidi olarak bildirilen tüberküloz hâlen dünyada ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sırada olmasıyla önemini korumaktadır^(2,3). Ayrıca tek ajana bağlı enfeksiyöz hastalıkların neden olduğu ölümler arasında HIV/AIDS'in önüne geçen başlıca ölüm nedenidir^(2,4,5).

Dünya genelinde TB insidansı giderek azalsa da, 2018 yılında hâlen 10 milyon insanda yeni TB olgusunun saptandığı ve 251.000'nin HIV'li hastalar olmak üzere 1.5 milyon insanın TB nedeni ile öldüğü bildirilmektedir⁽⁶⁾. Dünya nüfusunun yaklaşık çeyreğinin de latent TB ile enfekte olduğu ve tanısı konulamayan üç milyon insanın var olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle tüberküloz kontrolü, küresel sağlık programının en önemli öncelikleri arasındadır^(2,6). Türkiye'de ise 2017 yılında tüberküloz insidansı ve tüberküloz nedeni ölüm oranı sırasıyla 100.000'de 17 ve 0.53 iken, 2018 yılında çok az bir düşüş ile 100.000'de 16 ve 0.51 olarak bildirilmiştir^(6,7). Bu azalma oranı ile DSÖ'nün tüberkülozu sonlandırma ve bitirme programındaki hedefine henüz ulaşılammıştır. Temaslıların ve yüksek risk gruplarının sistematik taraması ile birlikte ilaç duyarlılık testlerinin uygulanması, erken tanı ve tedavi izlemine dayalı TB sonlandırma programının en önemli bileşenlerindedir^(8,9).

Tüberkülozun sonlandırılmasında en büyük engel tanıda gecikme veya tanı konulmamış olgularla birlikte ilaç dirençli TB'lerin ortaya çıkması ve yayılmasıdır^(1,2). İlaça dirençli tüberkülozun ortaya çıkışı, son 20 yıldaki tüberkülozla ilişkili morbidite ve mortalitenin azaltılmasında kaydedilen ilerlemeyi tersine çevirme potansiyeline sahiptir⁽¹⁰⁾. Dirençli TB, dünya çapında antimikrobiyal direnç nedeniyle ölümlerin üçte birine neden olup, 2017'de yaklaşık 230.000 ölüm yaşanmıştır^(11,12). Antimikrobiyal dirence bağlı ölümlerin 2050 yılına kadar yıllık 10 milyona çıkabileceği öngörülmektedir⁽¹¹⁾. Bu hesap ile dirençli TB'lerin

bu ölümlerin yaklaşık 2.5 milyonundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir⁽¹²⁾. Bu sayının azaltılabilmesi için aktif olguların izlemi, yerel ilaç duyarlılık testlerinin sürdürülmesi ve ÇİD'li hastaların kişiselleştirilmiş tedavisi gereklidir⁽⁵⁾.

Özellikle tüberküloz tedavisinde en önemli iki temel ilaç olan izoniyazid ve rifampisin'e direnç olarak tanımlanan çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olguları küresel bir tehdit oluşturmakta ve tüberküloz kontrolünü zorlaştırmaktadır⁽¹³⁻¹⁵⁾. DSÖ 2019 raporunda, dünya genelinde tüberkülozlu olguların 484.000'inin rifampisin direnci geliştirdiği, bunların %78'inin çok ilaca dirençli olduğu bildirilmektedir. Dünyada 2018'de yeni ve tedavi edilmiş olgularda ise ÇİD direnç oranının sırasıyla %3.4 ve %18 olduğu bildirilmiştir⁽⁶⁾. Türkiye'de ise 2017 yılında yeni ve önceden tedavi görmüş olgularda ÇİD TB oranı sırası ile %3.3 ve %14, 2018 yılında ise sırasıyla %3.5 ve %12'dir^(6,16).

Dirençli suşların kontrolünde, ana strateji hastalara etkili tedavinin verilmesi için duyarlılık sonuçlarının bilinmesidir. Güncel tüberküloz tanı ve tedavi rehberinde tüm olgular için birinci basamak ilaç duyarlılığının belirlenmesi önerilmektedir⁽¹⁷⁾. Ancak, dirençli suşların oranı bölgeler arasında veya aynı bölgede yıllar içerisinde farklılık gösterebilir⁽¹⁸⁾. Bu nedenle ilaç duyarlılık testlerinin düzenli yapılması ve izlenmesi, ilk sıra tedavide kullanılan ilaçların seçiminde ve tüberküloz yayılımının önlenmesinde oldukça yararlı etkiye sahiptir⁽⁴⁾. Ayrıca, bölgesel antitüberküloz ilaç direnç oranları ve TB durumu hakkında epidemiyolojik bilgiler özellikle antimikrobiyal dirence karşı giderek artan küresel mücadelede önemli bir rol oynamaktadır⁽¹⁰⁾.

Bu çalışmada, Ocak 2013- Kasım 2019 yılları arasında hastanemizde izole edilen *M. tuberculosis* kompleks suşlarının ve birinci basamak anti TB ilaçlara duyarlılık oranlarının retrospektif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnek Seçimi: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi,

Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji Birimine Ocak 2013 ve Kasım 2019 tarihleri arasında klinik olarak tüberküloz şüphesi ile gönderilmiş tüm örnekler araştırmaya dâhil edilmiştir. *M. tuberculosis* kompleks saptanmış ve antitüberküloz ilaç duyarlılık testi çalışılmış tüm örneklerin sonuçları restrospektif olarak incelenmiştir. Sonuçlar örnek bazlı ve hasta bazlı değerlendirilmiştir.

Mikobakteriyal Kültür: Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na gelen steril olduğu kabul edilen örnekler dekontaminasyon işlemi uygulanmayarak konsantre edildikten sonra direkt kültürü yapılmış, steril olmayan örneklerin ise önce N-asetil-L-sistein ve %4'lük sodyum hidrosit yöntemini kapsayan Mycoprosafe® (Salubris, Türkiye) ticari kiti ile homojenizasyon ve dekontaminasyonu yapılmıştır. Steril ve işlemlenmiş örneklerde aside dirençli basil (ARB) varlığı kinyoun boyama yöntemi kullanılarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

Hazırlanan örneklerin Löwenstein-Jensen (LJ) katı besiyerine (Becton Dickinson, ABD) ve üretici firmasının talimatları doğrultusunda "Mycobacteria Growth Indicator Tube" (MGIT) (Becton Dickinson, ABD) sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Katı besiyerinde üreme varlığı sekiz hafta ve BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) kültür sistemi ile de altı hafta boyunca izlenmiştir. Pozitif olan örneklerin kolonileri, kinyoun boyama yöntemi ile aside dirençli basil açısından değerlendirilmiştir. Üreme olan ARB pozitif örneklerde *M. tuberculosis* kompleks ile atipik mikobakteri (tüberküloz dışı mikobakteri) ayrımı amacıyla *M. tuberculosis* kompleks'e ait MPT64 antijenini saptamaya yönelik bir test olan "TBC Identification Test" (Becton Dickinson, ABD) üretici talimatlarına göre uygulanmış ve yorumlanmıştır.

Antitüberküloz Duyarlılık Testi: Örneklerden üretilen *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 streptomisin, izoniyazid, rifampisin ve etambutol (SİRE) kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Önerilen katkı maddeleri eklenmiş MGIT tüplerinde streptomisin, rifampisin, izoniyazid ve etambutol için son konsantrasyonlar sırasıyla

1 µg/mL, 1 µg/mL, 0.1 µg/mL ve 5 µg/mL olarak ayarlanmıştır. Kontrol tüplerinde yeterli üremeye ulaşıldığında, ilaç içeren tüplerdeki floresan artışı kontrol tüplerindeki floresan artışı ile cihaz tarafından karşılaştırılarak sonuçlar duyarlı ve dirençli olmak üzere belirlenmiştir. Dirençli sonuçlar bulunduğu durumda test yinelenmiştir.

BULGULAR

Ocak 2013-Kasım 2019 tarihleri arasında gelen 21620 örnekten 473 (%2.2) tanesi *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanmıştır. Gelen örneklerin 300'ünün (%63.4) akciğer, 173'ünün (%36.6) akciğer dışı örnek olduğu görülmüştür. 2013-2019 yılları arasında *M. tuberculosis* kompleks pozitifliği sırasıyla, %2.3, %3, %2.2, %2, %2.3, %2 ve %1.7 olarak bulunmuştur.

Aynı hastalara ait yineleyen örnekler çıkartıldığında toplam 365 hastaya ait pozitiflik belirlenmiştir. Duyarlılık testi sonuçlanan 321 hastaya ait izolatların 276 (%85.7)'si streptomisin (SM), izoniyazid (INH), rifampisin (RIF) ve etambutol (ETM) içeren birinci seçenek ilaçların tümüne duyarlı saptanmıştır. SM, INH, RIF ve ETM direnç oranları ise sırasıyla, %7.5, %6.8, %2.2 ve %0.6 olarak bulunmuştur. Bu verilerde en yüksek direnç oranına sahip olan birinci seçenek antitüberküloz ilacın streptomisin olduğu görülmüştür. ÇİD oranı ise %0.6 olarak saptanmıştır. Akciğer ve akciğer dışı örneklerde, tek ve toplam ilaç duyarlılık verileri Tablo 1'de gösterilmiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

Dünya genelinde hızlı tanı testlerinin ortaya çıkması ile tanı süresinde kısalma, aktif temaslıların daha ayrıntılı izlenmesi, hasta odaklı tedavi süreci gibi geniş kapsamlı, kanıta dayalı kontrol ve tedavi yönetimi sayesinde tüberküloz insidansında azalma olduğu görülmektedir^(8,17). Türkiye'de de 2016 yılında insidans 100.000'de 15.3 iken, 2017 yılında 14.3'e düşmüştür⁽¹⁹⁾. Ancak, göç ve seyahatlerin günümüzde hız kazanması nedeni ile tüberküloz insidansı ve direnç için durumun sıkı izlenmesi ülkemizdeki düşük prevalansın korunması açısından önemlidir.

Tablo 1. İlaç duyarlılık verileri.

SIRE Duyarlı	Akciğer (N=196) n, %	Akciğer dışı (N=125) n, %	Toplam (N=321) n, %
Tek ilaç direnci	170 (86.7)	105 (84)	275 (85.7)
INH	9 (4.6)	7 (5.6)	16 (5)
SM	8 (4.1)	9 (7.2)	17 (5.3)
RIF	2 (1)	1 (0.8)	3 (0.9)
ETM	1 (0.5)	1 (0.8)	2 (0.6)
İkili ilaç direnci			
INH+RIF	1 (0.5)	0	1 (0.3)
INH+SM	3 (1.5)	1 (0.8)	4 (1.2)
SM+RIF	1 (0.5)	1 (0.8)	2 (0.6)
Üçlü ilaç direnci			
INH+SM+RIF	1 (0.5)	0	1 (0.3)
Toplam ilaç direnci			
INH	14 (7.1)	8 (6.4)	22 (6.8)
SM	13 (6.6)	11 (8.8)	24 (7.5)
RIF	5 (2.6)	2 (1.6)	7 (2.2)
ETM	1 (0.5)	1 (0.8)	2 (0.6)
ÇİD	2 (1)	0	2 (0.6)

SM: Streptomisin; INH: İzonyazid; RIF: Rifampisin; ETM: Etambutol; ÇİD: İzonyazid ve rifampisin direnci

Tablo 2. Türkiye'den çeşitli çalışmalarda antitüberküloz ilaçlara duyarlılık sonuçları.

Bölge	İller	İzolatin ait olduğu yıl	n	INH (%)	SM (%)	RIF (%)	ETM (%)	ÇİD (%)
Marmara	İstanbul, Selek ve ark. ⁽⁴⁾	2010-2016	252	20.6	12.3	7.5	6.7	7.1
	İstanbul, Yazısız ve ark. ⁽²³⁾	2011-2012	974	20.2	14.4	8.4	6.5	7
	İstanbul, Öncel ve ark. ⁽²⁴⁾	2011-2017	251	20	9.6	5.2	8.2	4
	Sakarya, Terzi ve ark. ⁽²⁵⁾	2012-2017	466	9.8	7.7	4.1	4	4.1
	Edirne, Öner ve ark. ⁽²⁶⁾	2016-2017	120	8.3	7.5	3.3	3.3	4.2
	² Mersin, Aksu ve ark. ⁽²⁷⁾	2010-2014	244	20.1	11.1	6.6	4.1	5.7
Akdeniz	¹ Adana, Alişkan ve ark. ⁽¹⁴⁾	2005-2010	373	3.2	2.9	2.1	0.5	2.1
	² Adana, Etiz ve ark. ⁽²⁸⁾	2013	123	13.5	8.1	1.8	2.7	1.8
	Antalya, Öde ve ark. ⁽²⁹⁾	2014-2015	644	13.4	18.2	8.9	2.8	6.5
	Diyarbakır, Özcan ve ark. ⁽³⁰⁾	2012-2015	415	21.4	15.7	6.3	6.7	5.1
Doğu	Mardin, Kabak ve ark. ⁽³¹⁾	2012-2018	81	13.6	4.9	6.2	6.2	-
	Erzurum, Özmen ve ark. ⁽³²⁾	2014-2016	120	9.2	5.8	3.3	0.2	1.7
	¹ Bolu, Behçet ve ark. ⁽³³⁾	2008-2018	138	10.1	12.3	4.3	2.9	2.9
	Samsun, Çaycı ve ark. ⁽³⁴⁾	2014-2017	78	1.2	8.9	0	1.2	-
Karadeniz	Zonguldak, Mindaş ve ark. ⁽³⁵⁾	2013-2018	428	16.2	0.9	1	1.5	0.7
	Bizim çalışmamız	2013-2019	321	6.8	7.5	2.2	0.6	0.6

¹BACTEC MGIT 460; ²Akciğer Tüberkülozlu olgular; SM: Streptomisin; INH: İzonyazid; RIF: Rifampisin; ETM: Etambutol; ÇİD: İzonyazid ve rifampisin direnci

Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Tüberküloz Daire Başkanlığı istatistiklerinde, İzmir'de insidans 100.000'de 0.3 olarak bildirilmiştir⁽¹⁹⁾. Hastanemizde 2000-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada, *M. tuberculosis* kompleks prevalansı %4.5 olarak bildirilmiştir⁽¹⁸⁾. 2013-2019 yılları arasını kapsayan çalışmamızda ise bu oranın %2.2'ye düştüğü belirlenmiştir. Doğru ve hızlı tanı testlerinin kullanıma girmesi, doğrudan gözetimli tedavi uygulamalarının ve sıkı tüberküloz kontrol programının uygulanmasının bu düşüşte etkisinin olabileceğini düşünüyoruz.

Türkiye'de Verem Savaşı 2016 Raporu'nda INH, RIF, ETM ve SM direnç oranlarının bir önceki rapora göre yükseldiği, sırasıyla %13.8, %6.4, %4.2 ve %9.4'e ulaştığı, ÇİD TB'nin ise % 4.6'e çıktığı bildirilmiştir^(20,21). Güncel Verem Savaş Raporu'nda streptomisin haricinde ilaç direnç oranlarında bir azalma olmakla birlikte, hâlen yüksek (INH, RIF, ETM ve SM direnci sırasıyla %11.9, %4.2, %3.7 ve %10.6, ÇİD %3.3) olduğu görülmektedir⁽¹⁶⁾. Çalışmamızda, ÇİD direnci çok düşük oranda (%0.6) saptanmıştır. Primer antitüberküloz ilaç direnç oranlarının da oldukça düşük olduğu

görülmektedir. İlaç direnç oranları en yüksek SM (%7.5) ve INH (%6.8)'e karşı saptanmıştır.

2000-2002 yılları arasını kapsayan bölgemizden bir çalışmada, %5.1 SM, %6.8 INH %9.3 RİF ve %4.2 ETM direnci saptanmış, bunlar içinde %1.7 oranında ÇİD-TB bulunduğu bildirilmiştir⁽¹⁸⁾. Çalışmamızda belirlenen güncel veriler ile karşılaştırıldığında, INH direnç oranı değişmezken, SM direncinin %5.1'den %7.5'e yükseldiği, RIF ve ETM direncinde, ayrıca ÇİD oranında düşüş olduğu görülmektedir. Bölgemizden Komurcuoğlu ve ark.nın⁽¹⁾ çalışmalarında, 1999-2004 yıllarında akciğer tüberküloz olgularından izole edilen 297 TB kökeninde %9.7 SM, %12 INH, %14 RIF ve %6 ETM'e direnç belirlenmiş ve ÇİD %3.7 oranında saptanmıştır⁽¹⁾. Çalışmamızda ise, akciğer tüberküloz olgularında saptanan SM, INH, RIF, ETM ve ÇİD direnç oranları (%6.6, %7.1, %2.6, %0.5 ve %0.5) çok daha düşük olarak bulunmuştur.

Akciğer dışı TB olgularıyla ilgili Taşbakan ve ark.⁽²²⁾ çalışmalarında, yedi yıllık izlemde 171 olgu izlenmiş ve INH, RIF ve ÇİD direnç oranları sırasıyla %6.3, %4 ve %3.4 olarak bildirilmiştir⁽²²⁾. Çalışmamızda, altı yıllık izlemde 125 akciğer dışı *M. tuberculosis* kompleks izole edilmiş ve bu grupta %6.4 INH ve %1.6 RIF direnci saptanırken, çok ilaca direnç saptanmamıştır. Marmara, Akdeniz ve Doğu bölgesindeki illerde yapılan bazı güncel çalışmalarda, çalışmamız ve güncel Türkiye verilerine kıyasla yüksek oranda primer ilaç direncinin olduğu görülmektedir. Karadeniz bölgesine ait çalışmalarda ise düşük ilaç direnç oranları görülse de çalışmamız verilerine göre daha yüksek orandadır (Tablo 2)^(4,14,23-35).

Marmara bölgesinde bulunan İstanbul'da yapılan üç çalışmada, oldukça yüksek INH direncinin saptandığı; bunu SM direncinin takip ettiği; RIF ve ETM direncinin ise Türkiye verileri ve bizim verilerimize göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir^(4,23,24). Aynı bölgede bulunan Sakarya ve Edirne'de ise birbirine benzer daha düşük direnç oranlarının elde edildiği görülmüştür^(25,26). Bu çalışmalarda^(25,26), SM direnç oranının çalışmamız sonucu ile aynı oranda olduğu, diğer ilaç oranlarının ise daha yüksek olduğu gözle çarpılmaktadır.

Akdeniz bölgesine bakıldığında, Aksu ve ark.⁽²⁷⁾ tarafından, Mersin'de yapılan çalışmada İstanbul'daki çalışmalara benzer şekilde INH ve SM direncinin yüksek oranda olduğu görülmektedir⁽²⁷⁾. Adana ve Antalya'da, benzer oranda INH ve ETM direnci saptanırken, Antalya'ya ait çalışmada, SM ve RIF direncinin daha yüksek olduğu görülmektedir^(28,29).

Diyarbakır'da 2012-2015 yılları, Mardin'de 2012-2018 yılları arasında yapılan çalışmalarda, RIF ve ETM direncinin yüksek olduğu dikkat çekmektedir⁽³⁰⁾. SM direnç oranının Mardin ve Erzurum'da ise benzer olduğu, ancak çalışmamıza kıyasla daha düşük oranda saptanmıştır. Erzurum'da RIF ve ETM direncinin daha düşük bulunduğu görülmektedir^(31,32).

Tüm çalışmalarda en yüksek direnç oranı INH'e karşı saptanmıştır. Çalışmamız ve Türkiye Verem Savaş Raporu verilerine kıyasla İstanbul, Mersin, Adana ve Diyarbakır ait çalışmalarda yüksek ilaç direnç oranlarının görülmesinde bu şehirlerin yoğun ve heterojen nüfusu, daha fazla oranda göç alması, buna bağlı olarak bireylerin farklı immun sistem yanıtları, farklı tedavi ve kontrol politikalarının etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Karadeniz bölgesinde, Zonguldak'a ait bir çalışmada en yüksek direnç INH'a karşı saptanırken, Bolu ve Samsun'dan bildirilen çalışmalarda en yüksek direnç çalışmamızla benzer şekilde SM'ye karşı saptanmıştır⁽³³⁻³⁵⁾. Yüksek oranda SM direncinin görülmesi genel olarak enfeksiyonlarda farklı tedavi politikaları, tedavi uyumsuzluğu, hastalara bağlı bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi SM'nin diğer enfeksiyonlarda da kullanılması veya aminoglikozit sınıfında diğer antibiyotikler kaynaklı çapraz direnç nedeniyle olabilir. Samsun'da oldukça düşük INH direnci olduğu görülmüştür. RIF ve ETM direncinin ise Bolu'ya ait çalışmada daha yüksek olduğu görülmektedir^(33,34). Çalışmamızda yalnızca Samsun'a⁽³⁴⁾ ait çalışmaya göre, daha yüksek INH ve RIF direnci saptanmıştır.

Tek ilaç direnç durumunu incelediğimizde, Sakarya'ya ait çalışma ile benzer oranlarda (%5.6-6) INH ve SM direncine sahip olduğumuz görülmektedir⁽²⁵⁾.

Özellikle beklenmeyen ve genel olarak kontaminasyon olarak değerlendirilen tek RIF ve ETM direncinin çalışmalarda %1.2-2.4 ve %0.4-4 arasında değiştiği ortaya çıkmaktadır^(4,23-25,27-30,33). Tek RIF direncinin Antalya'da %2.4⁽²⁹⁾, tek ETM direncinin ise İstanbul'a ait iki çalışmada^(4,24) %4 ve %3 olmak üzere en yüksek oranda saptandığı görülmüştür^(4,24,29). Çalışmamızda, tek ETM ve RIF direnci sırasıyla %0.9 ve %0.6 oranında çok düşük bulunmuştur.

Diğer birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda, ikili direnç paternleri arasında SM ve INH birlikteliğinin daha sık olduğu saptanmıştır^(4,23,24,26-30,33). İstanbul ve Antalya'da bildirilen güncel üç çalışmada sırasıyla %4.3, %3 ve %2 oranında tüm ilaçlara direnç varlığı dikkat çekmektedir^(23,24,29). Çalışmamızda tüm ilaçlara direnç saptanmamıştır.

Çalışmamızda, sonuçların geriye dönük incelenmesi, önceden tedavi almış ve nüks eden olarak direncin gruplandırılmamasına neden olmasıyla bir kısıtlılık oluşturmaktadır.

Saptadığımız direnç oranlarının ülke verileri ve diğer çalışmalardaki verilerden daha düşük olması sevindiricidir. Yerel surveyans araştırmalarının her biri, ilaç direncinin izlenmesi için mevcut bilginin artırılması, ulusal ve uluslararası epidemiyolojik verilere önemli katkı sağlaması bakımından önemlidir. Bu çalışmaların özellikle hastaların klinik ve tedavi bilgilerini içeren verilerle beraber çok merkezli ve düzenli olarak yapılması tüberküloz ile mücadelemize önemli katkı sağlayacaktır.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun, 01.02.2021 tarih ve 2021/03-50 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by Dokuz Eylül University Ethics Committee (01.02.2021; 2021/03-50).

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

KAYNAKLAR

1. Komurcuoglu B, Senol G, Balci G, Yalnız E, Ozdena E. Drug resistance in pulmonary tuberculosis in new and previously treated cases: Experience from Turkey. *J Infect Public Health*. 2013;6(4):276-82. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2013.02.005>
2. Glasauer S, Altmann D, Hauer B, Brodhun B, Haas W, Perumal N. First-line tuberculosis drug resistance patterns and associated risk factors in Germany, 2008-2017. *PLoS One*. 2019;14(6): e0217597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217597>
3. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):354-73. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux011>
4. Selek MB, Baylan O, Görenek L. Bir eğitim ve araştırma hastanesinde 2010-2016 yılları arasında izole edilen *Mycobacterim tuberculosis* kompleks suşlarının birinci basamak antitüberküloz ilaçlara duyarlılık durumlarının araştırılması. *Nobel Med*. 2019;15(2):40-6.
5. Lange C, Chesov D, Heyckendorf J, Leung CC, Udwadia Z, Dheda K. Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment. *Respirology*. 2018;23(7):656-73. <https://doi.org/10.1111/resp.13304>
6. WHO. Global Tuberculosis Control: World Health Organization Report 2019. WHO/HTM/TB/2019. World Health Organization, Geneva, 2020. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
7. WHO. Global Tuberculosis Control: World Health Organization Report 2018. WHO/HTM/TB/2018. World Health Organization, Geneva, 2019. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
8. Lönnroth K, Migliori GB, Abubakar I, D'Ambrosio L et al. Towards tuberculosis elimination: an action framework for low-incidence countries. *Eur Respir J*. 2015;45(4):928-52. <https://doi.org/10.1183/09031936.00214014>
9. WHO. World Health Organization 67th World Health Assembly. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. A67/11. Geneva, World Health Organization, 2014.
10. Law S, Piatek AS, Vincent C, Oxlade O, Menzies D. Emergence of drug resistance in patients with tuberculosis cared for by the Indian health-care system: a dynamic modelling study. *Lancet Public Health*. 2017;2(1): e47-55. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(16\) 30035-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(16) 30035-4).
11. TB Europe Coalition. Tuberculosis: the cornerstone of

- the AMR threat. Amsterdam: TB Europe Coalition 2015.
http://www.tbcoalition.eu/wp-content/uploads/2015/03/AMR_brochure_spreads.pdf (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
12. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. London: Wellcome Trust and HM Government, 2016.
https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
 13. Erköse Genç G, Satana D, Yıldırım E, Erturan Z, Yeğenoğlu Y, Uzun M. Evaluation of FluoroType MTB for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and GenoType MTBDRplus for determining rifampisin and isoniazid resistance. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2018;32(4):999-1004.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1466662>
 14. Alışkan HE, Bostanoğlu E, Turunç T ve ark. Retrospektif olarak tüberküloz laboratuvarının altı yıllık sonuçları ve antimikrobiyal ilaçlara direnç oranları. *Turk Toraks Derg.* 2013;14;53-8.
<https://doi.org/10.5152/ttd.2013.11>
 15. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(3):154-60.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.10.022>
 16. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye'de verem Savaşı 2018 Raporu. Ankara. <https://www.toraks.org.tr/userfiles/file/Turkiyede-Verem-Savas-2018-Raporu.pdf> (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
 17. T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Tanı ve Tedavi Rehberi 2019. Ankara. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz_db/haberler/Tuberkuloz_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_/Tuberkuloz_Tani_ve_Tedavi_Rehberi.pdf (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
 18. Esen N, Gündüz AT. Dokuz Eylül Üniversitesi'nde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında ilaç direnci (2000-2002). *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2003;33(4):337-42.
 19. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz_db/dosya/Istatistikler/2_Yillara_Gore_Toplam_TB_Olgu_Hizi_ve_TB_Insidansi_2005-2017.pdf (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
 20. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye'de verem Savaşı 2016 Raporu. Ankara. <https://www.toraks.org.tr/userfiles/file/Turkiyede-Verem-Savas-2016-Raporu.pdf> (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
 21. T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye'de verem Savaşı 2015 Raporu. Ankara. <https://www.toraks.org.tr/userfiles/file/Turkiyede-Verem-Savas-2015-Raporu.pdf> (Erişim tarihi: Aralık, 2019)
 22. Taşbakan M. S, Akdağ D, Kahraman H, Akyol D, Taşbakan M, Çavuşoğlu C. Kültür ile kanıtlanmış akciğer dışı tüberküloz: ilaç duyarlılığı ve genetik profil analizi. *Tuberk Toraks.* 2018;66(3):234-8.
<https://doi.org/10.5578/tt.67376>
 23. Yazısız H, Hırçın Cenger H, Yazısız V, Kılıç L, Altın S. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarında birinci basamak anti-tüberküloz ilaçlara direnç trendleri: Türkiye'den üçüncü basamak bir hastane çalışması. *Tuberk Toraks* 2019;67(2):92-101.
<https://doi.org/10.5578/tt.68201>
 24. Öncel B, Karahasan A, İlki A, Söyletir A, Söyletir G. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarında duyarlılık oranları. *ANKEM Derg.* 2019;33(1):1-5.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2019.1823>
 25. Terzi HA, Demir Ö, Karakeçe E, Köroğlu M, Altındiş M. *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının anti-tüberküloz ilaçlara direnç oranlarında yıllara göre değişim; Sakarya. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2019;4(1):47-56.
<https://doi.org/10.26453/otjhs.441168>
 26. Öner O, Özdemir İE, Elmacı K, Eryıldız C. Resistance rates of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates obtained from clinical samples to major antituberculous drugs: a study in Edirne, Turkey. *Turkish Med Stud J.* 2018; 5:28-31.
<https://doi.org/10.4274/tmsj.2018.05.02.0002>
 27. Aksu M, Şaşmaz T, Bayrak H. Akciğer tüberkülozlu olgulardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında primer tüberküloz ilaç direncinin araştırılması. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi.* 2019;4(2):122-30.
<https://doi.org/10.35232/estudamhsd.524166>
 28. Etiz P, Altınsu AT. Akciğer tüberkülozu olan 232 yeni olgunun retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2018;48(2):117-24.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.117>
 29. Önde M, Yeğin SE, Karakoç FY, Yavuz Ö, Özdemir OY. 2014-2015 yılları Antalya bölge tüberküloz laboratuvarı çalışmaları. *Türk Toraks Derneği 19. Yıllık Kongresi, 6-10 Nisan 2016, Belek, Antalya.* 2016: TPS-281.
 30. Özcan N, Bozdağ H, Ezin Ö, Özekinci T, Gül K. Susceptibility of first-line antituberculosis drugs in Southeastern Turkey. *Int J Med Sci Clin Invent.* 2016;3(9):2175-81.
<https://doi.org/10.18535/ijmsci/v3i9.15>
 31. Kabak M, Çil B, Hocalı I, Sezgi C, Taylan M, Düzenli U. Tuberculosis cases in Mardin between 2012 and 2018. *East J Med.* 2019;24(3):330-4.
<https://doi.org/10.5505/ejm.2019.49368>

32. Özmen E, Aslan A, Uçar M, Aydın H, Yılmaz A. Erzurum bölge tüberküloz laboratuvarında izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının primer anti-tüberküloz ilaçlara direnç oranları. ANKEM Derg. 2017;31(2):53-8.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2017.053>
33. Behcet M, Karabork S, Avcioğlu F, Karaibrahim A, Kurtoglu MG. Evaluation of the resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains to antituberculous drugs. Exp Biomed Res. 2019;2(4):143-8.
<https://doi.org/10.30714/j-ebr.2019454842>
34. Tanrıverdi Çaycı Y, Avan T, Bilgin K, Birinci A. Klinik örneklerden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Belek, Antalya; 2018: TPS-166.
35. Mindaş İ, Köktürk F, Cömert F. 2013-2018 yılları arasında izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının değerlendirilmesi. XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Belek, Antalya; 2018: TPS-164.

Çanakkale’de Tonsillofarenjitli Hastaların Boğaz Kültürlerinden İzole Edilen Beta Hemolitik Streptokokların Grup Dağılımlarının ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi^S

Determination of Group Distributions and Antibiotic Resistance Profiles of Beta- Hemolytic Streptococci Isolated from Throat Cultures of Patients with Tonsillopharyngitis in Canakkale Province

Mehzat Altun*[©], Binnur Meriçli Yapıcı**[©]

*Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Çanakkale, Türkiye

**Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji AD, Çanakkale, Türkiye

Atf/Cite as: Altun M, Meriçli Yapıcı B. Çanakkale’de tonsillofarenjitli hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen beta hemolitik streptokokların grup dağılımlarının ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):180-8.

Öz

Amaç: Tonsillofarenjitin bakteriyel etkenleri olan A, C ve G grubu beta hemolitik streptokoklar (BHS) çeşitli hastalıklara yol açmakta, morbidite ve mortaliteyi artırmaktadır. Bu çalışmada, akut tonsillofarenjit tanılı hastaların boğaz kültürlerinden identifiye edilen BHS’ların grup dağılım yüzdelerinin ve çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarının saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Ekim 2017 ve Mayıs 2018 tarihleri arasında, yaşları 1-80 aralığında olan 200 tonsillofarenjitli hastadan boğaz kültürleri toplanmıştır. Bakteriyel izolatlar Gram boyama, basitrasin-trimetoprim sülfametoksazol, katalaz ve L-Pirolidonil β-Naftilamid gibi konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmıştır. BHS’lerin serogruplandırmaları için lateks aglütinasyon testi kullanılmıştır. Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenmiştir. Kontrol olarak *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 suşu kullanılmıştır. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre inhibisyon zon çap ölçümleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: İki yüz boğaz kültüründen 34 (%17) BHS izole edilmiştir. BHS grup dağılım yüzdeleri %44.1 (15) A, %29.4 (10) C, %23.5 (8) G ve %2.9 (1) F olarak bulunmuştur. Penisilin, vankomisin ve levofloksasin antibiyotiklerine izolatların tamamında %100 duyarlılık belirlenmiştir. Yüzde 29.4 ile en yüksek dirençlilik ampicilin antibiyotiklerine bulunurken, bunu %26.5 ile klindamisin, %23.5 ile eritromisin %14.7 ile amoksisilin-klavulanik asit ve tetrasiklin, %11.8 ile sefotaksim ve seftriakson, %8.8 ile klaritromisin ve %2.9 ile kloramfenikol takip etmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, C grubu streptokok ve G grubu streptokokların bazı antibiyotiklere AGS’den daha düşük direnç gösterdiğini ortaya koydu. Bu bulgulara dayanarak BHS grup dağılımları ve antibiyotik direnç profilleri belirli periyotlarla tekrarlanmalı ve halk sağlığı sürveyans çalışmaları ile önlemler alınmalıdır.

Anahtar kelimeler: Beta Hemolitik Streptokoklar (BHS), tonsillofarenjit, antibiyotik direnç profilleri

ABSTRACT

Objective: Group A, C and G beta-hemolytic streptococci (BHS) are bacterial agents of tonsillopharyngitis, and cause various diseases and increase morbidity and mortality. In this study, we aimed to determine the percentage of group distribution and the rate of antibiotic resistance of BHS identified from the throat cultures of patients with acute tonsillopharyngitis.

Method: The throat swabs were collected from 200 patients with tonsillopharyngitis aged 1-80 years between October 2017 and May 2018. Bacterial isolates were identified by conventional methods such as Gram staining, bacitracin-trimethoprim sulfamethoxazole, catalase, and L-pyrrolidonyl β-naphthylamide. Latex agglutination test was used for serogrouping BHS. The antibiotic susceptibility profiles of BHS were determined by Kirby Bauer disc diffusion method. *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 strain was used as a control. Inhibition zone diameters were evaluated according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria.

Results: Thirty-four (17%) BHS were isolated from 200 throat swap specimens. Distribution percentages of BHS group were determined as 44.1% (15) for A, 29.4% (10) C, 23.5% (8) G and 2.9% (1) F. All isolates were 100% susceptible to penicillin, vancomycin and levofloxacin. The highest resistance (29.4%) was found against ampicillin followed by clindamycin (26.5%), erythromycin (23.5%), amoxicillin-clavulanic acid and tetracycline (14.7%), cefotaxime and ceftriaxone (11.8%), clarithromycin (8.8%) and chloramphenicol (2.9%).

Conclusion: This study revealed that Group C, and Group G Streptococci had lower resistance to some antibiotics than Group A Streptococci. Based on the findings, the BHS group distributions and antibiotic resistance profiles should be repeated at certain intervals and precautions should be taken with public health surveillance studies.

Keywords: Beta- Hemolytic Streptococci (BHS), tonsillopharyngitis, antibiotic resistance profiles

Alındığı tarih / Received:
27.12.2019 / 27.December.2019

Kabul tarihi / Accepted:
03.03.2021 / 03.March.2021

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

M. Altun 0000-0001-7363-5056
B. Meriçli Yapıcı 0000-0002-3213-5095

✉ byapici@comu.edu.tr

^S Bu araştırma, 1st International Symposium on Biodiversity Research (ISBR 2019)’da (2-4 Mayıs, 2019, Çanakkale) poster 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

Küresel olarak A-G'ye gruplanan BHS'ler yetişkinler ile çocuklarda invaziv ve non-invaziv bakteriyel hastalıkların etkeni olarak ilk 10 arasında gösterilmektedir⁽¹⁻³⁾. İnsanlarda enfeksiyonlara yol açan Lancefield'in C ve G gruplarını içeren BHS'lerin insidansı dünya çapında giderek artmaktadır⁽⁴⁾.

Yapılan çalışmalarda, bakteriyemi, endokardit, menenjit, artrit, osteomyelit ve pnömoni gibi invaziv enfeksiyonlara yol açan CGS/GGS'nin boğazda kolonizasyon oranları AGS'den (*Streptococcus pyogenes*) yüksek bulunmuştur^(5,6). Bu gruba giren türlerin neden olduğu hastalıkların klinik spektrumu ve streptokok sonrası sekel oluşumu *S. pyogenes* enfeksiyonlarına çok benzemektedir⁽⁷⁾. AGS ve CGS/GGS türleri %72 sekans benzerliği ile taksonomik olarak birbirlerine çok yakın olup, M proteini, yüzey proteinleri, fibronektin-bağlayıcı proteinler, streptolysin S ve streptolysin O gibi birçok virülans faktörü içermektedir⁽⁸⁻¹¹⁾.

Akut tonsillofarenjit (AT) tonsiller ve farenksin akut enfeksiyonu olup, ABD'de insidansı acile başvuran 15 yaş altı çocuklarda 600.000/yıl olarak bildirilmiştir⁽¹²⁾. Çoğu olguya farklı virüsler yol açarken, olguların %15-30'undan AGS sorumlu tutulmaktadır⁽¹³⁾.

Etkili tedavi mevcut olmasına rağmen, invaziv streptokok enfeksiyonları ile dünya çapında tahminen yıllık 500 000'den fazla ölüm bu hastalık ile ilişkilendirilmiştir⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) veri tabanına göre; ABD'de 1-2.5 milyon tonsillofarenjit olgusu, 12 000-25 000 invaziv enfeksiyon ve yaklaşık 1 250–2 000 ölüm için AGS sorumlu tutulmuştur. Son zamanlarda insanda enfeksiyona yol açan CGS/GGS türlerine yönelik çalışmalar da artmaktadır⁽¹⁸⁾.

Laboratuvar teşhisi ve ardından uygun antimikrobiyal tedavi, özellikle çocuklarda akut romatizmal ateş (ARA) ve romatizmal kalp hastalığı (RKH) gibi immünolojik komplikasyonlar ile post-streptokokal glomerulonefrit (PSGN) gibi hastalıkları önlemek için gerekmektedir⁽⁷⁾.

Streptokok enfeksiyonlarının tedavisi penisilinler veya sefalosporinler ile yapılmaktadır. Alerjik hastalarda makrolidler ve/veya linkozamidler ilk seçenek olarak tercih edilmektedir. Antibiyotik duyarlılık testlerine bağlı olarak hastaların tedavisinde tetrasiklin, vankomisin veya florokinolon antibiyotikleri de tercih edilmektedir⁽¹⁹⁾.

Hastalık, hızlı teşhis ve uygun antibiyotik tedavisi ile önlenilmektedir. Teşhiste gecikme, hekimlerin ampirik tedavi uygulamasına ve gereksiz antibiyotik kullanımına bağlı antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarında artışa yol açmaktadır⁽²⁰⁾. Sürekli değişen antibiyotik direnç belirleyicileri streptokokal enfeksiyonların tedavisini etkilemektedir. AGS'de penisilin ve diğer beta laktam antibiyotiklerine duyarlılık devam ederken, diğer grup BHS'lerde (BGS, CGS ve GGS) son zamanlarda duyarlılığın azaldığı rapor edilmiştir^(21,22). İnsanlardan izole edilen AGS, BGS ve *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) izolatlarında tedavide alternatif olarak kullanılan makrolidler, linkozamidler ve florokinolonlar gibi antibiyotiklere dirençliliğin yaygın olarak görüldüğü saptanmıştır^(23,24). AGS izolatlarında makrolid dirençlilik oranının Kanada'da %8-9'a⁽²⁵⁾, ABD'de %48'lere⁽²⁶⁾, İtalya, Finlandiya, Japonya, İspanya ve Türkiye'de %60'lara⁽²⁷⁾ kadar çıktığı bildirilmiştir. ABD'de AGS izolatlarındaki klindamisin direnci %1 olarak saptanmıştır⁽²⁸⁾.

Bu çalışmada, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi servis ve polikliniklerinde tonsillofarenjit tanısı almış 200 hastanın boğaz kültürlerinden izole edilen BHS'lerin identifikasyonu ile grup dağılım yüzdeleri ve antibiyotik duyarlılık profillerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Çalışmamızda Ekim 2017-Mayıs 2018 tarihleri arasında, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi, poliklinik ve ser-

vislerinde (Acil, Kulak Burun Boğaz, Aile Hekimliği ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalları) akut tonsillofarenjit tanılı 200 hastadan, klinik asistanları tarafından amies besiyerli taşıma swab⁽²⁹⁾ ile alınan boğaz kültür örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya antibiyotik tedavisine başlamış tonsillofarenjitlilerin boğaz kültürleri dâhil edilmemiştir. Her katılımcı Helsinki Bildirgesi uyarınca bilgilendirilmiş bir onay formu imzalamıştır.

Boğaz kültür örneklerinin azaltma yöntemi ile %5 koyun kanlı agar ekimleri yapılmış ve %5-10 CO₂ içeren anaerobik koşullar altında 24h inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında koloniler hemoliz yapma ve morfolojik özelliklerine göre değerlendirilmiştir⁽³⁰⁾. Gram boyama, L-pirolidonil β-naftilamid, katalaz, basitrasin duyarlılık ve sülfametoksazol-trimetoprim dirençlilik testleri ile BHS kolonilerinin identifikasyonu yapılmıştır⁽³⁰⁻³²⁾. BHS grup dağılımları hızlı lateks aglütinasyon test kiti (Plasmatec, Birleşik Krallık) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır⁽³³⁾.

BHS'lerin antibiyotik duyarlılık testleri penisilin G (10 U), ampisilin (10 µg), vankomisin (30 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg), levofloksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg), klaritromisin (15 µg) ve kloramfenikol (30 µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, Birleşik Krallık) ile %5 koyun kanlı Muller Hinton agarda CLSI önerileri doğrultusunda, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır^(31,34). *S. pyogenes* ATCC 19615 suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

Veriler (yaş, cinsiyet, BHS grupları ve antibiyotik duyarlılık profilleri) bilgisayara kaydedilmiş ve istatistiksel analizleri SPSS 22 programı kullanılarak ki-kare testi ile yapılmıştır. "p<0.05" bulguları istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir⁽³⁵⁾.

BULGULAR

Bu çalışmada, yaşları 1-80 arasında değişen 200 tonsillofarenjitli hastanın boğaz kültür örneklerinden 34 (%17) BHS izole edilmiştir. Lancefield gruplandırma-larına göre izolatların %44.1'i (15) AGS, %29.4'ü (10)

CGS, %23.5'i (8) GGS ve %2.9'u (1) FGS olarak bulunmuştur. Hastanenin farklı bölümlerinden temin edilen BHS'lerin serogrup dağılımları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. BHS'lerin grup dağılımları, izolat numaraları ve temin edildikleri anabilim dalları.

BHS Grupları	İzolat Numaraları	Ana Bilim Dalları
AGS	1, 164 10, 136 17, 20, 45, 52, 96, 101, 118, 127, 130, 153, 193	Kulak Burun Boğaz Acil Tıp Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
CGS	111, 125, 172 2, 83, 90, 107 42, 95, 134	Acil Tıp Aile Hekimliği Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
GGS	8, 155 21, 33, 192 161	Acil Tıp Kulak Burun Boğaz Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
FGS	145, 178 37	Aile Hekimliği Acil Tıp

BHS: Beta hemolitik streptokok, AGS: A grubu streptokok, CGS: C grubu streptokok, GGS: G grubu streptokok, FGS: F grubu streptokok.

Tonsillofarenjitli hastalardan alınan 200 boğaz kültür örneğinin %64'ü (128) ≥15 yaş bireylere, %36'sı (72) <15 yaş çocuklara aittir. A, C, G ve F olarak gruplandırılan 34 BHS izolatının 22'si kadın ve 12'si erkek olup, 19'unun 15 yaş üzerinde, 15'inin ise 15 yaş ve altında olduğu bulunmuştur. Klinik izolatların BHS gruplarındaki yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 2'de verilmiştir. AGS çocuklarda (≤15 yaş), diğer grup BHS'ler (C, G ve F) erişkinlerde (>15 yaş) yaygın görülmüştür. Yaş, cinsiyet ve BHS grup dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.096).

Tablo 2. BHS gruplarının cinsiyete ve yaşa göre dağılımları (<15, 15 ve >15).

BHS	Erkek	Kadın	<15 yaş	15 yaş	>15 yaş
AGS	5	10	9	2	4
CGS	4	6	3	-	7
GGS	3	5	1	-	7
FGS	-	1	-	-	1
Toplam	12	22	13	2	19

BHS: Beta hemolitik streptokok, AGS: A grubu streptokok, CGS: C grubu streptokok, GGS: G grubu streptokok, FGS: F grubu streptokok.

Tablo 3. Beta hemolitik streptokokların antibiyotik duyarlılık profilleri.

	GAS n (%)			GCS n (%)			GGS n (%)			FGS n (%)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
P	0	0	15 (100)	0	0	10 (100)	0	0	8 (100)	0	0	1 (100)
AM	5 (33.3)	0	10 (66.7)	4 (40)	0	6 (60)	1 (12.5)	0	7 (87.5)	0	0	1 (100)
AMC	3 (20)	2 (13.3)	10 (66.7)	1 (10)	2 (20)	7 (70)	1 (12.5)	2 (25)	5 (62.5)	0	0	1 (100)
E	5 (33.3)	0	10 (66.7)	2 (20)	1 (10)	7 (70)	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50)	0	0	1 (100)
VA	0	0	15 (100)	0	0	10 (100)	0	0	8 (100)	0	0	1 (100)
DA	5 (33.3)	0	10 (66.7)	2 (20)	2 (20)	6 (60)	2 (25)	0	6 (75)	0	0	1 (100)
T	2 (13.3)	2 (13.3)	11 (73.3)	2 (20)	2 (20)	6 (60)	1 (12.5)	2 (25)	5 (62.5)	0	0	1 (100)
CTX	4 (26.7)	0	11 (73.3)	0	0	10 (100)	0	0	8 (100)	0	0	1 (100)
CRO	4 (26.7)	0	11 (73.3)	0	0	10 (100)	0	0	8 (100)	0	0	1 (100)
C	1 (6.7)	0	14 (93.3)	0	1 (10)	9 (90)	0	1 (12.5)	7 (87.5)	0	0	1 (100)
LEV	0	0	15 (100)	0	0	10 (100)	0	0	8 (100)	0	0	1 (100)
CLR	1 (6.7)	0	14 (93.3)	1 (10)	0	9 (90)	1 (12.5)	0	7 (87.5)	0	0	1 (100)

n: İzolat sayısı, P: Penisilin G, E: Eritromisin, CTX: Sefotaksim, CLR: Klaritromisin, VA: Vankomisin, DA: Klindamisin, CRO: Seftriakson, AM: Ampisilin, C: Kloramfenikol, TE: Tetrasiklin, AMC: Amoksilin-klavulanik asit, LEV: Levofloksasin, R: Dirençli, I: Orta Duyarlı, S: Duyarlı

Çalışmamızın sonuçlarına göre, 34 BHS izolatlarının tamamı penisilin, vankomisin ve levofloksasin antibiyotiklerine %100 duyarlı bulunmuştur. CGS ve GGS klinik izolatlarında sefotaksim ve seftriakson antibiyotiklerine de duyarlılık belirlenmiştir. FGS izolatında hiçbir antibiyotiğe karşı direnç gözlenmemiştir. BHS izolatlarının 10'u (%29.4) ampisiline dirençli, amoksilin-klavulanik asite 5'i (%14.7) dirençli ve 6'sı (%17.6) orta duyarlı, eritromisine 8'i (%23.5) dirençli ve 4'ü (%11.8) orta duyarlı, klindamisine 9'u (%26.5) dirençli ve 2'si (%5.9) orta duyarlı, kloramfenikole 1'i (%2.9) dirençli ve 2'si (%5.9) orta duyarlı, tetrasikline 5'i (%14.7) dirençli ve 6'sı (%17.6) orta duyarlı, klaritromisine 3'ü (%8.8) dirençli, sefotaksim ve seftriaksona 4'er izolat (%11.8) dirençli bulunmuştur.

Çanakkale ilindeki tonsillofarenjit hastalardan izole edilen AGS, CGS, GGS ve FGS izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 3).

TARTIŞMA

Piyojenik BHS'ler AGS (*S. pyogenes*), BGS (*Streptococcus agalactiae*), CGS ve GGS (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*) insanlarda çeşitli hastalıklarla ilişkili farklı türler içeren, Gram pozitif bakteriyel patojenler olarak bilinmektedir. AGS invaziv ve non-invaziv enfeksiyonlara yol açan en önemli farenjit ajanı olarak gösterilmektedir⁽³⁶⁻⁴⁰⁾. AGS tonsillofarenjit ve impetigo gibi invaziv olmayan, hafif belirtileri

olan enfeksiyonlar ile kızıl, osteomyelit, nekrotizan fasiit, puerperal enfeksiyon, bakteriyemi, sepsis, menenjit, endokardit ve streptokoksik toksik şok sendromu (STSS) gibi şiddetli seyreden enfeksiyonlara yol açmaktadır⁽⁴¹⁻⁴³⁾. CGS ve GGS, AGS ile benzer antijenik yapılar içermekte, ARA ve RKH gibi morbidite ve mortalitesi yüksek hastalıklara yol açmaktadır^(44,45).

AGS enfeksiyonlarının daha çok gelişmekte olan ülkelerde yaşayanları etkilediği ve dünyadaki ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sırada yer aldığı bildirilmiştir⁽¹⁷⁾. Gelişmiş ülkelerde çocuklarda ve yetişkinlerde streptokok prevalansı yaklaşık %4-10 iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran %15'lere kadar çıkmaktadır⁽⁴⁶⁾. Çocuklarda tonsillofarenjitin bakteriyel etkeni olarak AGS, erişkinlerde ise CGS ve GGS gösterilmektedir^(47,48). Başarı ve ark.⁽⁴⁹⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, çocuklarda (≤ 15 yaş) %63.6 oranında AGS, erişkin bireylerde (>15 yaş) ise diğer BHS grupları saptanmıştır. Çalışmamızda, çocuklardan (≤ 15 yaş) %73.3 (11/15) oranında AGS, erişkin hastalardan %78.9 (15/19) oranında diğer grup BHS'ler izole edilmiştir. Literatürdeki bazı çalışmalarda^(50,51), AGS enfeksiyonlarının erkeklerde, bizim çalışmamızda ise kadınlarda daha fazla olduğu görülmüştür.

Mumbai'de⁽⁵⁾ hastaların boğaz kültürlerinden %18 (77/429), Etopya'da⁽⁵²⁾ %24 (56/233), Tamil Nadu'da⁽⁵³⁾

%12 (124/1040), Tayland'da⁽⁵⁴⁾ %25 (54/220) ve %20.7 (35/169)⁽⁵⁵⁾, Hindistan'da⁽⁵⁶⁾ %16 (34/218) oranında BHS izole edilmiştir. Bu değerler araştırmamızdaki %17 (34/200) BHS oranıyla uyumludur.

Yapılan bu çalışmalarda izolatların %83.1'i (64 izolat) C ve G grubu, %16.8'i (13 izolat) A grubu⁽⁵⁾; %44.6'sı (25 izolat) F, %39.2'si (22 izolat) G, %10.7'si (6 izolat) A, %3.5 (2 izolat) C ve 1 izolat B grubu⁽⁵²⁾; %15.3'ü (19 izolat) A, %25'i (31 izolat) G ve %59.7'si (74 izolat) C grubu⁽⁵³⁾; %50'si (27 izolat) C, %30'u (16 izolat) G, %15'i (8 izolat) A ve %6'sı (3 izolat) F grubu⁽⁵⁴⁾; %6.5'i (11 izolat) A, %2.4'ü (4 izolat) B, %2.4'ü (4 izolat) C, %8.3'ü (14 izolat) G ve %0.6'sı (1 izolat) F grubu⁽⁵⁵⁾; %21'i (7 izolat) C, %21'i (7 izolat) G grubu ve %59'u (20 izolat) A grubu⁽⁵⁶⁾ BHS olarak gruplandırılmıştır. Mathur ve ark.⁽⁵⁷⁾ tarafından yapılan çalışmada, boğaz kültüründen izole edilen 26 adet BHS izolatının 18'i A, 7'si G ve 1'i F şeklinde sero gruplandırılmıştır.

Ülkemizde Berkiten ve ark.⁽⁵⁸⁾ tarafından yapılan çalışmada, boğaz kültürlerinden 51'i A, 11'i G, 8'i F, 4'ü C, 4'ü B ve 3'ü D grubu olmak üzere 81 BHS saptanmıştır. Çalışmamızda, 34 BHS klinik izolatının %44.1'i (15 izolat) A, %29.4'ü (10 izolat) C, %23.5'i (8 izolat) G ve %2.9'u (1 izolat) F olarak gruplandırılmıştır.

Bakteriyel tonsillofarenjit tedavisinde çeşitli antibiyotikler kullanılmaktadır⁽⁵⁹⁾. Günümüzde antibiyotik dirençliliği tüm dünyayı etkileyen önemli bir sorundur. ABD'de Hastalık Kontrol Merkezleri (CDC) tarafından her yıl 2 milyon kişinin antibiyotiğe dirençli bakterilerle enfekte olduğu ve bunların 23 000'inin öldüğü bildirilmiştir⁽⁶⁰⁾. Mikrobiyolojik test yapılmadan yalnızca kliniğe bakılarak streptokokal akut tonsillofarenjit vakalarında %20-%25'e kadar yanlış pozitiflik oranı bildirilmiştir⁽⁶¹⁾.

Yurt içinde ve yurt dışında BHS'lerin (farenjit ve tonsillofarenjitlilerden izole edilen) tedavide kullanılan çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlendiği birçok çalışma yapılmıştır ve izolatların tamamı penisilin antibiyotiğine duyarlı bulunmuştur^(53-55,57). Hindistan'da vankomisin^(56,57) ve levofloksasin⁽⁵⁷⁾ antibiyotiklerine direnç gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda da 34 BHS izolatı bu üç antibiyotiğe duyarlı

bulunmuştur. Tayland'da yapılan bir çalışmada⁽⁵⁵⁾ AGS'lerde seftriaksona direnç gözlenmezken, çalışmamızda %11.8 oranında dirençlilik saptanmıştır. İzolatların eritromisin dirençlilik oranları; Tayland'da 2016'da⁽⁵⁴⁾ %28, 2018'de⁽⁶²⁾ %7.2 ve 2020'de⁽⁵⁵⁾ %18.2, Hindistan'da⁽⁶³⁾ %46, İran'da⁽⁶⁴⁾ %33.9, Yunanistan'da⁽⁶⁵⁾ %18.8 ve Güney Kore'de⁽⁶⁶⁾ %25.7 olarak bildirilmiş olup, bu oran ile çalışmamızdaki %23.5'lik oran uyumluluk göstermektedir. Klindamisine Tayland'da⁽⁵⁵⁾ %18.2 ve %6.4⁽⁶²⁾, Yunanistan'da⁽⁶⁵⁾ %1.4, Hindistan'da⁽⁶³⁾ %9.5, İran'da⁽⁶⁴⁾ %13.5 ve Güney Kore'de⁽⁶⁶⁾ %15.8 olarak dirençlilik rapor edilmiş ve bu değerler çalışmamızda bulunan %26.5 oranının altındadır. Çalışmamızda, kloramfenikole dirençlilik (%2.9), Yunanistan'dan⁽⁶⁵⁾ (%0.8) yüksek, Tayland'dan⁽⁶²⁾ (%7.1 ve %18.2) düşük bulunmuştur. Tetrasikline dirençlilik Hindistan'da⁽⁶⁷⁾ %19.4 ve Tayland'da⁽⁵⁴⁾ %52 olup, çalışmamızdaki %14.7 değerinden daha yüksek bulunmuştur. Hindistan'daki⁽⁵⁶⁾ amoksilin-klavulanik asite ve sefotaksime (sırasıyla %10 ve %20) dirençlilik oranları araştırma sonuçlarımızla (sırasıyla %14.7 ve %11.8) benzer bulunmuştur. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, ampisilin⁽⁶⁸⁾ dirençlilik oranı %13.5 iken, bizde %29.4 olarak bulunmuştur. Birçok çalışmada, BHS'lerin ampisiline duyarlı oldukları bildirilmiştir^(53,57). Klaritromisine dirençlilik oranı İran'da⁽⁶⁴⁾ %33.9, Hindistan'da⁽⁶⁷⁾ %4.9 ve Fransa'da⁽⁶⁹⁾ %9.6 olup, çalışmamızda %8.8 olarak bulunmuştur.

Tüm dünyada streptokokal ve poststreptokokal enfeksiyonların tedavisi çeşitli antibiyotikler ile yapılmaktadır. Uygun antibiyotik seçiminin antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre yapılması ve farklı coğrafi bölgelerde BHS'lerin antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların belirli zaman aralıklarında tekrarlanması ve daha fazla sayıda hasta ile yapılması gerekmektedir.

Teşekkür

Boğaz kültür örneklerinin temininde yardımcı olan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nin değerli hocaları ve asistanlarına teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart

Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun, 24.05.2017 ve 2017-10 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

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

Finansal Destek: Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FDK-2017-1314 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Canakkale Onsekiz Mart University Ethics Committee (24.105.2017; 2017-10).

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

Funding: Canakkale Onsekiz Mart University Scientific Research Projects Unit (Project No. FDK-2017-1314).

KAYNAKLAR

1. Sigauque B, Roca A, Mandomando I, et al. Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(2):108-13. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318187a87d>
2. Zhu M, Hu Q, Mai J, Lin Z. Analysis of pathogenic bacteria and drug resistance in neonatal purulent meningitis. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2015;53(1):51-6.
3. Chauhan D, Mokta K, Kanga A, Grover N, Singh D, Bhagra S. Group B streptococcal meningitis in children beyond the neonatal period in sub-Himalayan India. *Ann Indian Acad Neurol*. 2015;18(1):71-3. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.151049>
4. Williams GS. Group C and G streptococci infections: emerging challenges. *Clin Lab Sci* 2003; 16:209-13.
5. Bramhachari PV, Kaul SY, McMillan DJ, Shaila MS, Karmarkar MG, Sriprakash KS. Disease burden due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (group G and C *Streptococcus*) is higher than that due to *Streptococcus pyogenes* among Mumbai school children. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 2):220-3. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015644-0>
6. McDonald M, Towers RJ, Andrews RM, Carapetis JR, Currie BJ. Epidemiology of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in tropical communities, Northern Australia. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(11):1694-700. <https://doi.org/10.3201/eid1311.061258>
7. Brandt CM, Spellerberg B. Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. *Clin Infect Dis* 2009;49(5):766-72. <https://doi.org/10.1086/605085>
8. Babbar A, Itzek A, Pieper DH, Nitsche-Schmitz DP. Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence genes in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from Vellore, India. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(5):581-6. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0595-2>
9. Shannon BA, McCormick JK, Schievert PM. Toxins and superantigens of group A streptococci. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA., Braunstein M, Rood Jİ (eds) *Gram-Positive Pathogens*. ASM Books, Wiley; 2019:55-66. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch5>
10. Šmitran A, Vuković D, Opavski N, et al. Influence of subinhibitory antibiotic concentration on *Streptococcus pyogenes* adherence and biofilm production. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2018; 65(2):229-40. <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.026>
11. Klos M, Wójkowska-Mach J. Pathogenicity of virulent species of group C streptococci in human. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2017; 2017:9509604. <https://doi.org/10.1155/2017/9509604>
12. National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2011 Emergency Department Summary Tables. [http://www.cdc.gov/nchs/data/ahcd/nhamcs_emergency/2011_ed_web_tables.pdf] (Erişim tarihi: Ağustos 2018).
13. Alper Z, Uncu Y, Akalin H, Ercan I, Sinirtas M, Bilgel NG. Diagnosis of acute tonsillopharyngitis in primary care: a new approach for low-resource settings. *J Chemotherapy* 2013;25(3):148-55. <https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000071>
14. Muhtarova A, Mihova K, Markovksa R, Mitov I, Kaneva R, Gergova R. Molecular emm typing of Bulgarian macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2019; 67:14-7. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.033>
15. Burián K, Berencsi K, Endrész V, et al. *Chlamydia pneumoniae* exacerbates aortic inflammatory foci caused by murine cytomegalovirus infection in normocholesterolemic mice. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(6):1263-6. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1263-1266.2001>
16. Tataro K, Gotoh K, Okumiya K, et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility, and characterization of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes* in Japan. *J Infect Chemother*. 2020;26(3):280-4. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.10.004>
17. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(11):685-94.

- [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70267-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70267-X)
18. Baracco GJ. Infections caused by group C and G *Streptococcus* (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and others): epidemiological and clinical aspects. *Microbiol Spectr*. 2019;7(2).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0016-2018>
 19. Bonofiglio L, Gagetti P, García Gabarrot G, et al. Susceptibility to β -lactams in β -hemolytic streptococci. *Rev Argent Microbiol*. 2018;50(4):431-5.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.002>
 20. Ayanruoh S, Waseem M, Quee F, Humphrey A, Reynolds T. Impact of rapid streptococcal test on antibiotic use in a pediatric emergency department. *Pediatr Emerg Care*. 2009;25(11):748-50.
<https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e3181bec88c>
 21. Kimura K, Suzuki S, Wachino J-ichi, et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2890-7.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00185-08>
 22. Fuursted K, Steeger M, Hoffmann S, et al. Description and characterization of a *penicillin*-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* clone isolated from blood in three epidemiologically linked patients. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(12):3378-80.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkw320>
 23. Michos A, Koutouzi FI, Tsakris A, et al. Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* macrolide resistance of paediatric isolates during a 7 year period (2007-13). *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(8):2113-7.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkw116>
 24. Murayama SY, Seki C, Sakata H, et al. Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2650-3.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01716-08>
 25. Marcy SM. Treatment options for streptococcal pharyngitis. *Clin Pediatr (Phila)*. 2007;46(Suppl 1):36S-45S.
<https://doi.org/10.1177/0009922807299720>
 26. Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in the United States, 2002-2003. *Clin Infect Dis*. 2005;41(5):599-608.
<https://doi.org/10.1086/432473>
 27. Rubio-López V, Valdezate S, Alvarez D, et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC Microbiol* 2012;12:215.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-215>
 28. Tanz RR, Shulman ST, Shortridge VD, et al. North American Streptococcal Pharyngitis Surveillance Group. Community-based surveillance in the united states of macrolide-resistant pediatric pharyngeal group A streptococci during 3 respiratory disease seasons. *Clin Infect Dis* 2004;39(12):1794-801.
<https://doi.org/10.1086/426025>
 29. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton AD. Streptococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: American Society Microbiology, 2003:405-42.
 30. Olender A, Letowska I, Karyński M, Kiernicka-Ciekot K, Pels K. Problems with identification of beta-hemolytic *Streptococcus* resistant to bacitracin isolated from patients with pharyngitis. *Med Dosw Mikrobiol*. 2012;64(1):1-10.
 31. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları; 2002:506-23.
 32. Kaufhold A, Lutticken R, Schwien U. Few-minutes tests for the identification of group A streptococci and enterococci with chromogenic substrates. *Zentralbl Bakteriol*. 1989;272(2):191-5.
[https://doi.org/10.1016/s0934-8840\(89\)80006-4](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(89)80006-4)
 33. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Gram Positive Cocci Part II: Streptococci, Enterococci and the "Streptococcus-Like" Bacteria. Koneman EW (Ed) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2006:672-764.
 34. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI Document M100-523. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, ABD, 2018.
 35. Daniel WW. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*, 8th Ed. New York: John Wiley&Sons Inc; 1998:503-41.
 36. Sitkiewicz I, Hryniewicz W. Pyogenic streptococci - danger of re-emerging pathogens. *Pol J Microbiol*. 2010;59(4):219-26.
<https://doi.org/10.33073/pjm-2010-034>
 37. Gajdács M. Taxonomy and nomenclature of bacteria with clinical and scientific importance: current concepts for pharmacists and pharmaceutical scientists. *Acta Pharm Hung*. 2019;89(4):99-108.
<https://doi.org/10.33892/aph.2019.89.99-108>
 38. Tanaka H, Katsuragi S, Hasegawa J, et al. The most common causative bacteria in maternal sepsis-related deaths in Japan were group A *Streptococcus*: A nationwide survey. *J Infect Chemother*. 2019;25(1):41-4.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.10.004>

39. Ikebe T, Okuno R, Uchitani Y, et al. T serotyping of group A *Streptococcus* isolated from patients with pharyngitis or streptococcal toxic shock syndrome in Japan between 2005 and 2017. *J Infect Chemother.* 2020;26(2):157-61.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.10.010>
40. Wessels MR. Pharyngitis and Scarlet Fever. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA (Eds). *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City: University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
41. Martin JM. The mysteries of streptococcal pharyngitis. *Curr Treat Options Pediatr.* 2015;1(2):180-9.
<https://doi.org/10.1007/s40746-015-0013-9>
42. Basetti S, Hodgson J, Rawson TM, Majeed A. Scarlet fever: a guide for general practitioners. *London J Prim Care (Abingdon).* 2017;9(5):77-9.
<https://doi.org/10.1080/17571472.2017.1365677>
43. Ibia EO, Imoisili M, Pikiş A. Group A beta-hemolytic streptococcal osteomyelitis in children. *Pediatrics.* 2003;112(1 Pt 1): e22-6.
<https://doi.org/10.1542/peds.112.1.e22>
44. Haidan A, Talay SR, Rohde M, Sriprakash KS, Currie BJ, Chhatwal GS. Pharyngeal carriage of group C and group G streptococci and acute rheumatic fever in an Aboriginal population. *Lancet.* 2000;356(9236): 1167-9.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02765-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02765-3)
45. Hill HR. Group A streptococcal carrier versus acute infection: the continuing dilemma. *Clin Infect Dis.* 2010;50(4):491-2.
<https://doi.org/10.1086/650168>
46. Sims Sanyahumbi A, Colquhoun S, Wyber R, Carapetis JR. Global disease burden of Group A *Streptococcus*. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA (Eds) *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma: The University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016:1-44.
47. Ekelund K, Skinhsj P, Madsen J, Konradsen HB. Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999-2002: Epidemiological and clinical aspects. *Clin Microbial Infect.* 2005;11(7):569-76.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01169.x>
48. Ozkaya-Parlakay A, Uysal M, Kara A. Group A streptococcal tonsillopharyngitis burden in a tertiary Turkish hospital. *Turkish J Pediatr.* 2012;54(5):474-7.
49. Başarı F, Bayraktar B, Bulut E. Beta-hemolitik streptokokların gruplandırılması ve çeşitli antibiyotiklere dirençleri. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2008;38(3-4):106-11.
50. Sherkatolabbasieh H, Firouzi M, Shafizadeh S, Amiri I. Antibiotic susceptibility evaluation of bacterial agents causing infection in children with acute tonsillopharyngitis. *Infect Disord Drug Targets.* 2020.
<https://doi.org/10.2174/1871526520666201116102441>
51. Doğan M, Aydemir Ö, Güner ŞN, Feyzioğlu B, Baykan M. Antibiotic susceptibility of group A B-hemolytic streptococci isolated from tonsillar swab samples in 5-15 years old children. *Eur J Gen Med.* 2014;11(1):29-32.
<https://doi.org/10.15197/sabad.1.11.07>
52. Zegeye N, Asrat D, Woldeamanuel Y, et al. Throat culture positivity rate and antibiotic susceptibility pattern of beta-hemolytic streptococci in children on secondary prophylaxis for rheumatic heart disease. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):510.
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1841-3>
53. Anand T, Rajesh T, Rajendhran J, Gunasekaran P. Superantigen profiles of emm and emm-like typeable and nontypeable pharyngeal streptococcal isolates of South India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012; 11:3.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-3>
54. Tantivitayakul P, Lapidattanakul J, Vichayanrat T, Muadchiengka T. Antibiotic resistance patterns and related mobile genetic elements of pneumococci and β -hemolytic streptococci in Thai healthy children. *Indian J Microbiol.* 2016;56(4):417-25.
<https://doi.org/10.1007/s12088-016-0607-3>
55. Greer R, Althaus T, Ling C, et al. Prevalence of group A *Streptococcus* in primary care patients and the utility of C-reactive protein and clinical scores for its identification in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;102(2):377-83.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0502>
56. Naik TB, Nadagir SD, Biradar A. Prevalence of beta-hemolytic streptococci groups A, C and G in patients with acute pharyngitis. *J Lab Physicians.* 2016;8(1):45-9.
<https://doi.org/10.4103/0974-2727.176235>
57. Mathur P, Bhardwaj N, Mathur K, et al. Clinical and molecular epidemiology of beta-hemolytic streptococcal infections in India. *J Infect Dev Countr.* 2014;8(3):297-303.
<https://doi.org/10.3855/jidc.3216>
58. Berkiten R, Gurol SD. Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen beta hemolitik streptokoklarda çeşitli antibiyotiklere direnç. *İÜ Tıp Fak Mecm.* 2003;66(4):214-7.
59. Tewfik TL, Al Garni M. Tonsillopharyngitis: Clinical highlights. *J Otolaryngol* 2005;34(1)545-9.
60. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic/Antimicrobial Resistance. [<https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>] (Erişim: Ağustos 2018).
61. Gerber MA, Shulman ST. Rapid diagnosis of pharyngitis

- caused by group A Streptococci. Clin Microbiol Rev. 2004;17(3):571-80.
<https://doi.org/10.1128/CMR.17.3.571-580.2004>
62. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand, 2019. Antibiogram 2018. [http://narst.dmsc.moph.go.th] (Erişim: Nisan 2019).
63. Bhardwaj N, Mathur P, Behera B, Mathur K, Kapil A, Misra MC. Antimicrobial resistance in beta-haemolytic streptococci in India: a four-year study. Indian J Med Res 2018;147(1):81-7.
https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1517_16
64. Sayyahfar S, Fahimzad A, Naddaf A, Tavassoli S. Antibiotic susceptibility evaluation of group A *Streptococcus* isolated from children with pharyngitis: a study from Iran. Infect Chemother. 2015;47(4):225-30.
<https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.4.225>
65. Michos AG, Bakoula CG, Braoudaki M, et al. Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and emm types. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;64(3):295-9.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.004>
66. Kim HY, Uh Y. Macrolide resistance in β -hemolytic streptococci: changes after the implementation of the separation of prescribing and dispensing of medications policy in Korea. Yonsei Med J. 2004;45(4):591-7.
<https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.4.591>
67. Dhanda V, Chaudhary P, Toor D, Kumar R, Chakraborti A. Antimicrobial susceptibility pattern of β -haemolytic group A, C and G streptococci isolated from North India. J Med Microbiol. 2013;62(3):386-93.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.046672-0>
68. Uysal A, Durak Y, Akın D. Boğaz kültürlerinden izole edilen beta-hemolitik streptokokların identifikasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotik ve eritromisin direnç profillerinin belirlenmesi. Selçuk Univ Fen Fak Fen Derg. 2014;39:10-20.
69. Weber P, Filipecki J, Bingen E, et al. Genetic and phenotypic characterization of macrolide resistance in group A streptococci isolated from adults with pharyngo-tonsillitis in France. J Antimicrob Chemother. 2001;48(2):291-4.
<https://doi.org/10.1093/jac/48.2.291>

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.

