

Cilt / Volume 51

Sayı / Number 4

Aralık / December 2021

ISSN 0258-2171

e-ISSN 2458-7516



# Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

*Journal of Turkish Society of Microbiology*

- ✓ Sınırlı Antibiyotik Seçeneği Olan *Stenotrophomonas maltophilia* Enfeksiyonlarında Antibiyotik Direnç Profili
- ✓ Tek Sağlık Yaklaşımında Multidisipliner Uygulamalı Antibiyotik Duyarlılık Testi Eğitimi: ANADOLU PROJESİ
- ✓ *Candida* Vajiniti Tedavisinde Umut: İbreksafungerp
- ✓ *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* sp. ve *Giardia intestinalis*'in Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı: Optimizasyon Çalışması
- ✓ Eğirdir Gölü'nde (Isparta) *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. Varlığının Araştırılması

ISSN 0258-2171  
e-ISSN 2458-7516

---

# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

*JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY*

---



**Cilt / Volume 51**

**Sayı / Number 4**

**Aralık / December 2021**



# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

## JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 51 Sayı / Number 4 Aralık / December 2021

**Editör / Editor in Chief**

**Çağrı Ergin**

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli  
0000-0001-7783-8723

**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:** tmceditor@gmail.com  
www.tmc-online.org

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

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

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

**Yayın Türü:** Yerel Süreli

**Basım Yeri / Printed by**

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



**Tel:** (0212) 288 05 41  
**Faks:** (0212) 211 61 85  
**mail:** logos@logos.com.tr  
**web:** www.logosyayincilik.com

## Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

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

**Vildan Avkan Oğuz**, Dokuz Eylül Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir  
0000-0001-7648-7730

**Şöhret Aydemir**, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir  
0000-0001-8354-9100

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

**Banu Bayraktar**, Şişli Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul  
0000-0002-3128-0581

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

**Yunus Emre Beyhan**, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van  
0000-0002-1696-4803

**Fusun Can**, Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
0000-0001-9387-2526

**Nural Cevahir**, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
0000-0001-8764-7701

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

**Hande Dağcı**, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji  
Anabilim Dalı, İzmir  
0000-0003-1315-4247

**Funda Doğruman Al**, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
0000-0002-9118-3935

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

**Ayşe Erbay**, Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim  
Dalı, Yozgat  
0000-0001-8882-4124

**Bülent Ertuğrul**, Reyap İstanbul Hastanesi, Enfeksiyon  
Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul  
0000-0002-6372-6680

**Ufuk Hasdemir**, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
0000-0002-1606-0804

**Süleyha Hilmioğlu Polat**, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir  
0000-0001-8850-2715

**Arzu İlki**, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
0000-0003-3887-7003

**Macit İlkit**, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana  
0000-0002-1174-4182

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

**Ülkü Karaman**, Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu  
0000-0001-7027-1613

**Sema Aşkın Keçeli**, Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli  
0000-0002-2014-6395

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

**İpek Mumcuoğlu**, Ankara Şehir Hastanesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara  
0000-0002-6392-8880

**Esvet Mutlu**, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya  
0000-0001-8808-9182

**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

**Suna Seçil Öztürk Deniz**, Pamukkale Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli  
0000-0002-5440-5383

**Banu Sancak**, Hacettepe Demirel Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
0000-0002-0098-4674

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

**Burçin Şener**, Hacettepe Demirel Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
0000-0002-0724-3166

**Nüket Sivri**, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik  
Fakültesi, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul  
0000-0002-4269-5950

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

**Aynur Eren Topkaya**, Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
0000-0001-8781-1401

**Hatice Türk Dağı**, Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya  
0000-0002-0291-4987

**Ata Nevzat Yalçın**, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim  
Dalı, Antalya  
0000-0002-7243-7354

**Cavit Işık Yavuz**, Hacettepe Demirel Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara  
0000-0001-9279-1740

**Nisel Yılmaz**, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim  
ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, İzmir  
0000-0001-7435-2461

**Orçun Zorbozan**, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir  
0000-0002-9645-7085



## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### DERLEMELER / REVIEWS

- **COVID-19 Kanalizasyon Sürveyansı: SARS-CoV-2 nin Atıksudan Geri Kazanım Yöntemlerinin Değerlendirilmesi**  
*COVID-19 Sewage Surveillance: Evaluation of Recovery Methods of SARS-CoV-2 from Wastewater*  
Nursel KIRATLI YILMAZÇOBAN ..... 309-325
- **Candida Vajiniti Tedavisinde Umut: İbreksafungerp**  
*Hope in the Treatment of Candida Vaginitis: Ibrexafungerp*  
Ayşe Sultan KARAKOYUN, Macit İLKİT ..... 326-333

### ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / CLINICAL INVESTIGATIONS

- **Sınırlı Antibiyotik Seçeneği Olan Stenotrophomonas maltophilia Enfeksiyonlarında Antibiyotik Direnç Profili**  
*Antibiotic Resistance Profile of Stenotrophomonas maltophilia Infections with Limited Antibiotic Options*  
Gökçe Kader ARSLAN, Fatma ESENKAYA TAŞBENT, Metin DOĞAN ..... 334-340
- **Tek Sağlık Yaklaşımında Multidisipliner Uygulamalı Antibiyotik Duyarlılık Testi Eğitimi: ANADOLU PROJESİ**  
*Multidisciplinary Applied Antibiotic Sensitivity Testing Training in the One Health Approach: ANATOLIAN PROJECT*  
Serap SÜZÜK YILDIZ, Banu KASKATEPE, Özlem ÜNALDI, Hüsnüye ŞİMŞEK,  
Zeynep Ceren KARAHAN, Selçuk YILDIZ, Deniz GÜR ..... 341-347
- **Bir Üniversite Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Enterobacterales Takımı Üyelerinin Dağılımının ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının İncelenmesi**  
*Distribution and Antimicrobial Susceptibilities of Members of Enterobacterales Isolated from Blood Cultures in a University Hospital*  
Hasan Cenk MİRZA, Banu SANCAK ..... 348-353
- **Blastocystis sp., Cryptosporidium sp. ve Giardia intestinalis'in Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı: Optimizasyon Çalışması**  
*Diagnosis of Blastocystis sp., Cryptosporidium sp., and Giardia intestinalis by Multiplex PCR: An Optimization Study*  
Ali Ahmet KİLİMCİOĞLU, Nogay GİRİNKARDEŞLER, Tuba OYUR, Selin BÖLÜK SABUNCU,  
Didem DÜZYOL AZAK, Serhan GÖRGÜN, Işın AKYAR, Özgür KURT, Tanıl KOCAGÖZ,  
Ahmet ÖZBİLGİN ..... 354-362
- **Eğirdir Gölü'nde (Isparta) Cryptosporidium spp. ve Giardia spp. Varlığının Araştırılması**  
*Investigation of Cryptosporidium spp. and Giardia spp. in Lake Eğirdir (Isparta)*  
Tuğba SAĞLAM, Serdar DÜŞEN, Meral APAYDIN YAĞCI, Abdülkadir YAĞCI ..... 363-367
- **Bakteriyemi Etkeni Gram Negatif Bakterilerin Hızlı Tanımlanmasında Mikroarray ve Lizis Filtrasyon Sonrası MALDI TOS MS Yöntemlerinin Değerlendirilmesi**  
*Evaluation of Microarray and Lysis Filtration Combined MALDI TOS MS Procedures for the Identification of Gram Negative Bacteremia*  
Mehmet SOYLU, Ayşe ARSLAN, Şöhrem AYDEMİR, Alper TÜNGER ..... 368-374

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Karbapenem Dirençli <i>Enterobacterales</i> İzolatlarında Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden İlk KPC Bildirimi</b> <i>Investigation of Carbapenemase Genes in Carbapenem Resistant Enterobacterales Isolates: First KPC Report From Dokuz Eylul University Hospital</i> Şeyda Şilan OKALIN, Ayşe Nur SARI KAYGISIZ, Mahmut Cem ERGON, İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM .....</li> </ul>	<b>375-381</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Yatan Hasta Kümülatif Antibiyotik Duyarlılık Raporu (2020)</b> <i>Inpatient Cumulative Antibiotic Susceptibility Report of Afyonkarahisar Health Sciences University Research and Practice Hospital (2020)</i> Melahat GÜRBÜZ, Emek TÜRKEKUL ŞEN, Cengiz DEMİR, Berrin ESEN .....</li> </ul>	<b>382-392</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bir Üniversite Hastanesinde Anti-DFS70 Antikor Pozitif Olguların İki Yıllık Retrospektif Değerlendirilmesi</b> <i>Two-Year Retrospective Evaluation of Anti-DFS70 Antibody Positive Cases in a University Hospital</i> Rahime AKSOY, Ebru US .....</li> </ul>	<b>393-399</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><i>Candida parapsilosis</i> Tür Kompleksi ve <i>Lodderomyces elongisporus</i> İzolatlarının MALDI-TOF MS ile İdentifikasyonu</b> <i>Identification of Candida parapsilosis Species Complex and Lodderomyces elongisporus Isolates with MALDI-TOF MS</i> Engin KAPLAN, Ayşe Sultan KARAKOYUN, Deniz ALKAYA, Nevzat ÜNAL, Aylin DÖĞEN, Macit İLKİT .....</li> </ul>	<b>400-405</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hidrojel ve Silikon Hidrojel Kontakt Lens Kullanımı ile Konjonktivadaki Koagülaz Negatif Stafilokok Popülasyonu ve Biyofilm Oluşturan <i>Staphylococcus epidermidis</i> Arasındaki İlişki</b> <i>The Relationship Between the Use of Hydrogel and Silicone Hydrogel Contact Lenses and Coagulase-Negative Staphylococci Population in the Conjunctiva and Biofilm Forming Staphylococcus epidermidis</i> Zeynep GÜNGÖRDÜ DALAR, Güzin İSKELELİ, Mert Ahmet KUŞKUCU, Mehmet DEMİRCİ, Penbe ÇAĞATAY, Sevgi ERGİN, Ayşel KARATAŞ, Barış Ata BORSA, Zeynep TANER, Süleyman PELİT, Müzeyyen Mamal TORUN, Arif KAYGUSUZ, Kenan MİDİLLİ, Bekir S. KOCAZEYBEK, Hrisi BAHAR TOKMAN .....</li> </ul>	<b>406-414</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Salgınlarla İlişkili STEC Suşlarının Filogeni ve Virülans Genlerinin <i>in silico</i> Analizi</b> <i>In silico Analysis of Phylogeny and Virulence Genes in STEC Strains Associated with Outbreaks</i> Mehmet DEMİRCİ, Akın YİĞİN, Fadile Yıldız ZEYREK .....</li> </ul>	<b>415-420</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Maya Mantarlarının Hızlı Tanımlanmasında Lizis Filtrasyon Sonrası MALDI TOF-MS Yönteminin Kullanımı</b> <i>Use of MALDI TOF-MS Method After Lysis Filtration for Rapid Identification of Yeast</i> Sami EREN, Dilek Yeşim METİN, Süleyha HİLMİOĞLU POLAT .....</li> </ul>	<b>421-427</b>
DİZİN .....	<b>VII-XI</b>
YAZARLARA BİLGİ .....	<b>XII-XIII</b>

# COVID-19 Kanalizasyon Sürveyansı: SARS-CoV-2'nin Atıksudan Geri Kazanım Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

## COVID-19 Sewage Surveillance: Evaluation of Recovery Methods of SARS-CoV-2 from Wastewater

Nursel Kıratlı Yılmazçoban <sup>®</sup>

Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Sakarya Meslek Yüksekokulu, Çevre Koruma ve Kontrol Programı, Sakarya, Türkiye

**Atıf/Cite as:** Yılmazçoban NK. COVID-19 kanalizasyon sürveyansı: SARS-CoV-2'nin atıksudan geri kazanım yöntemlerinin değerlendirilmesi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):309-25.

### öz

*Atık Su Bazlı Epidemiyoloji (ABE) toplum sağlığı ile ilgili birçok veri içeren önemli bilgi havuzu niteliği taşıyan başarılı bir çevresel sürveyans aracıdır. Dünya, SARS-CoV-2'nin benzeri görülmemiş küresel yayılımı, insan sağlığı ve ekosistem servisleri üzerinde olumsuz sonuçlarının üstesinden gelmeye çalışmaktadır. Bu derlemede, atık suda SARS-CoV-2'nin saptanmasında karşılaşılan zorluklar, virüs konsantrasyonu ve ölçümü için kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması sunulmuştur. SARS-CoV-2 için uyarlanmış bir ABE çerçevesi erken uyarı sistemi için önemli bir adımdır. Virüs yayılımını atık su sürveyansı ile takip etmek klinik test sınırlamalarını azaltacaktır. Belirti göstermeyen olgularda virüsün uzun süreli inkübasyon süresine sahip olması, bulaşmaya devam etmesi virüs kontrolünün etkin yönetimi için hesaba katılmalıdır.*

*Optimize edilmiş tanı protokollerinin kullanılması, dezenfeksiyon stratejilerinin geliştirilmesi, atık suyun yeniden kullanımıyla ilişkili muhtemel sorunların bilimsel kanıtlarının artması, gelecekteki viral hastalık salgınlarının tespitini ve kontrol altına alınmasını iyileştirecektir.*

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2, atık su bazlı epidemiyoloji, halk sağlığı

### ABSTRACT

*Wastewater Based Epidemiology (WBE) is a successful environmental surveillance tool, which serves as a valuable information pool containing enormous data on public health. Efforts are being made globally to overcome the unprecedented worldwide spread of SARS-CoV-2 and its negative consequences on human health and the ecosystem. In this review, we present the difficulties encountered in detecting SARS-CoV-2 in wastewater and the comparison of methods used for virus concentration and measurement.*

*A WBE framework adapted for SARS-CoV-2 is a key step towards the development of an early warning system. Monitoring virus spread through wastewater surveillance will reduce limitations of clinical tests. For effective management of virus control in asymptomatic cases, it should be considered that the virus has a long incubation period and continues to be transmitted during that period.*

*Using optimized diagnostic protocols, developing disinfection strategies, and obtaining further scientific evidence on potential problems associated with waste water reuse will help improve the detection and control of future viral disease outbreaks.*

**Keywords:** SARS-CoV-2, wastewater based epidemiology, public health

**Alındığı tarih / Received:**  
12.03.2021 / 12.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
28.07.2021 / 28.July.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

N.K. Yılmazçoban 0000-0002-1609-2945

✉ nkiratli@subu.edu.tr

## GİRİŞ

COVID-19 pandemisinin etiyolojik ajanı; SARS-CoV-2'nin yayılmasını önlemek ve biyolojik tehlikesini belirlemek, önde gelen zorluklar arasındadır. Belirti göstermeyen olgularda virüsün uzun süreli inkübas-

yon süresine sahip olması, bulaşmaya devam etmesi virüsün hızlı bir şekilde yayılmasına yol açarak kontrol altına alınmasını engellemektedir. Bireylerin tıbbi taramasının yapıldığı bölgelerde SARS-CoV-2 yayılmasına ilişkin tahminler, bazı sorunlar nedeniyle büyük ölçüde eksik yapılabilmektedir. Düşük ve orta



gelirli ülkelerde yeterince test yapma olanağı olmadığı için eksik raporlama söz konusudur<sup>(1,2)</sup>. İzlanda gibi refah düzeyi yüksek ve nüfusu az olan ülkelerde ise her bireyin test edilmesi olası olmakla birlikte<sup>(3)</sup> küresel boyutta düşünüldüğünde bu uygulamanın çoğu ülke için pratik olmadığı, yavaş ve maliyetli olduğu görülmektedir<sup>(4)</sup>.

Toplum sağlığı ile ilişkili anlık verilerin toplanabileceği kanalizasyon sistemleri, virüs epidemiyolojisi hakkında veri toplamak için uygun belirteçler seçildiği taktirde avantaj oluşturmaktadır. Kanalizasyon sisteminin biyolojik, kimyasal takibine dayanan Atık Su Bazlı Epidemiyoloji (ABE), dünya genelindeki topluluklarda poliovirüsler, norovirüsler ve hepatit A gibi patojenik virüslerin ortaya çıkışı ve epidemiyolojisi hakkında bilgi edinmek için kullanılmıştır<sup>(5-7)</sup>. Atık sularında SARS-CoV-2'nin izlenmesi ilk önerildiğinde, hâkim bilimsel görüş, virüsün yeterince yüksek oranlarda atık suda bulunmayabileceğini hem virüsün kendisinin hem de tek zincirli RNA (ssRNA)'nın atık suda belirlenmesinin çok değişken olabileceğine dayanmakta idi. İnsan dışısında koronavirüs saptanması ile ilişkili güncel raporlar<sup>(8,9)</sup>, Avustralya<sup>(10)</sup>, İspanya<sup>(11)</sup>, İtalya<sup>(12)</sup>, Hollanda<sup>(13)</sup> ve Japonya<sup>(14)</sup> da dâhil olmak üzere bir dizi ülkeden kentsel atık suda SARS-CoV-2'nin ssRNA'sı belirlenmesine ilişkin yayınlar, bu endişeleri kısmen ortadan kaldırmıştır. Devam eden pandemi, ABE'nin toplumlarda bulaşıcı hastalık bulaşmasını tespit etmek ve yönetmek için kullanılabilirliği hipotezini sahada test etmek için anlamlı bir fırsat sağlamaktadır<sup>(15)</sup>. Dünya çapındaki birçok araştırma grubu, bu amaçla SARS-CoV-2 RNA'sını atık suda izlemek için harekete geçmiştir<sup>(15)</sup>. Atık suda SARS-CoV-2'nin izlenmesinde optimize edilen protokollerin kullanılması istenen yeterlilikte değildir ve çeşitli laboratuvarlarda tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek gibi halk sağlığı yanıtı olabilecek bilgilerin hassasiyeti hâlâ belirsizdir.

Bu derlemede, atık sudaki SARS-CoV-2 tanımlanmasında kullanılan metotlar (örneklem, konsantrasyon vb. gibi) tartışılmıştır. Genel olarak atık suda SARS-CoV-2 varlığı için gelişmiş izleme aracına gereksinim olduğu vurgulanmaktadır. Optimize edilmiş tanı protokollerinin kullanılması, dezenfeksiyon stratejilerinin

geliştirilmesi, atık suyun yeniden kullanımıyla ilişkili olası sorunların bilimsel kanıtlarının artması, gelecekteki viral hastalık salgınlarının tespitini ve kontrol altına alınmasını iyileştireceği beklenmektedir.

### Atık Su Bazlı Epidemiyoloji (ABE) ve Atık Su Matrisi

Toplum sağlığı ve su sistemleri arasındaki bağlantı eskilere dayanmaktadır. On dokuzuncu yüzyılda insanların büyük çoğunluğu, hastalıkların kötü hava-veya miasma- ile topraktan çıkan çürümüş maddelerden yayıldığına inanıyorlardı. Ancak, 1854'te John Snow, Londra'da kolera salgınının nedenini kanalizasyonla kontamine olmuş özel bir su pompasından kaynaklandığını saptayarak epidemiyolojinin doğmasına neden olmuştur<sup>(16)</sup>. Miasma teorisini çürüterek mikrop teorisinin doğmasına neden olan İngiliz hekim, sıhhi mühendislik reformlarına önemli etkisi olmuştur.

Atık sular, uyuşturucu ve çeşitli kimyasal atıkların bulunduğu, DNA, proteinler, lipitler ya da metabolizma atıkları gibi insan vücudu için sağlık ve hastalık belirteçleri olabilecek molekülleri içermektedir. Bu nedenle atık suların içeriği, toplum sağlığı ile ilgili birçok veri içeren önemli bilgi havuzu olma niteliği taşımaktadır. Atık Su Bazlı Epidemiyoloji yaklaşımı, bir arıtma tesisinden elde edilecek verilerle nüfus düzeyinde çalışmaların yapılabilmesini olası kılmaktadır. Yasa dışı uyuşturucuları takip etmekle başlayan atık su izleme çalışmaları, 1990'lı yıllara kadar dayanmaktadır<sup>(17)</sup>. Sonraki yıllarda Avrupa'daki kanalizasyon sistemi SCORE ağı ile düzenli takip edilmeye başlanmıştır<sup>(18)</sup>. Atık sularında SARS-CoV-2'nin varlığını araştıran gruplar, hastalık salgınlarının takip etmek için devam etmekte olan çalışmaların potansiyelini en üst düzeye çıkarmak hedefiyle<sup>(15)</sup> COVID-19 WBE Collaborative<sup>(19)</sup> iş birliğini kurmuşlardır. Bu küresel iş birliğine Avrupa SCORE ağı ve Küresel Su Patojeni Projesi de dâhildir<sup>(15)</sup>. Başka bir ABE yaklaşım örneğini Arizona Eyalet Üniversitesi'nde Dr. Halden ve meslektaşları daha büyük ölçekte tasarlayıp uygulamaya geçirmiştir. Dünya çapında 300'den fazla AAT örnekleri için bir bilgi deposu olan İnsan Sağlığı Gözlemevi'ni kurmuşlardır<sup>(5,20)</sup>. Dr. Halden, yaptıkları çalışmaları belirtmek için ABE kavramını yetersiz bularak daha

kapsamlı bir tanım -Kentsel Metabolizma Metrolojisi-kullanmayı tercih etmektedir<sup>(5)</sup>. Kentsel Metabolizma Metrolojisini (KMM), kentsel insan popülasyonlarının sağlığı, sürdürülebilirliği ve dayanıklılığı hakkında bilgi verebilen yeni bir bilimsel disiplin olarak tanımlamaktadır.

### Atık Sudaki SARS-CoV-2 Kaynakları

SARS-CoV-2'nin ana bulaşma yolları, enfektif damlacıkların solunumu ve doğrudan temas olarak bilinmesine rağmen<sup>(21,22)</sup> diğer önemli bir bulaşma yolu gastrointestinal (GI) sistemde SARS-CoV-2 replikasyonu sonucunda dışkı ile dağıtılmasıdır<sup>(23-26)</sup>. Virüs, birçok sporadik olgu ile sonuçlanan, hatta ölümcül bile olabilen fekal-oral yolla salgınlara neden olmaktadır<sup>(23,27,28)</sup>. Su kaynaklı çeşitli virüslerin bulaşma yeteneği göz ardı edilemeyecek endişe kaynağı olmaya devam etmektedir<sup>(29)</sup>. Enterik virüsler GI kanalını enfekte ederek çoğalır ve fekal yolla kanalizasyona, septik tanklara, su kaynaklarına deşarjları ile hava, su ve gıdaları kontamine edebilir<sup>(30)</sup>. Çeşitli yollarla insanları enfekte eden virüsler, hastalık belirtisi göstermeden de yayılabilirler. Virüslerin neden olduğu hastalıkların şiddeti, virüsün yaşamda kalmasına ve replikasyon kapasitesine bağlıdır<sup>(31,32)</sup>. Genel olarak enterik virüsler, çok düşük dozda (<20 partikül) bulaşıcıdır ve hastalığa neden olurlar<sup>(33)</sup>. Bazı raporlarda, enfekte insanlarda dışkıda yüksek ve bazen idrarlarda daha düşük konsantrasyonlarda virüs titreleri belirlenmiştir<sup>(28,34)</sup>.

Atık su sisteminde saptanan SARS-CoV-2 viral ssRNA fragmentleri, virüsün insan dışkısı ve idrar yoluyla kanalizasyon sistemine girdiğini göstermektedir<sup>(11,35,36)</sup>. İshal ve kusma dâhil olmak üzere gastrointestinal hastalık belirtilerinin sıklığı, doğrulanmış olgularda %2 ile %80'i arasında değişmektedir<sup>(37-39)</sup>. Neredeyse balgamdaki miktara yaklaşan SARS-CoV-2 ssRNA, dışkı örneklerinde %67 oranında pozitif test edilmiştir<sup>(8,38)</sup>. Diğer belirtilerin olduğu fakat GI bulguların olmadığı olgularda, ayrıca belirti göstermeyen olgularda ve belirtilerin kesilmesinden sonraki dört haftaya kadar dışkıda SARS-CoV-2 ssRNA varlığı gözlenmiştir<sup>(8, 38-42)</sup>. İlginç bir şekilde, solunum düzeldikten ve solunum örnekleri negatif bulunduktan

sonra da dışkıda SARS-CoV-2 ssRNA genellikle belirlenmiştir<sup>(8,34)</sup>. Yalnızca birkaç çalışma enfektif SARS-CoV-2'yi dışkı ve idrar örneklerinden<sup>(26,36,43)</sup> izole etmeyi başarmış olsa da birçok çalışmada dışkıda ve atık suda SARS-CoV-2 ssRNA saptanmıştır<sup>(11,13,44-46)</sup>. Bugüne kadar, dışkıdaki SARS-CoV-2 ssRNA'sının yutulmuş balgamdan mı yoksa GI içindeki aktif replikasyondan mı kaynaklandığı belirsizdir. Virüslerin GI içindeki aktif replikasyonu enfektif virionların atık su yoluyla yayılmasını önemli ölçüde etkileyecektir. Yapılan modelleme çalışmalarında atık suların önemli sayıda enfektif virion içerdiği varsayılmaktadır<sup>(9)</sup>. Enfektif SARS-CoV-2'nin dışkı ve atık su örneklerinden başarısız izolasyonu, enfektif virionların yokluğundan çok sağlam zarflı virionları izole etmenin zorluğundan kaynaklanıyor olabilir. Yüksek viral konsantrasyonlara sahip olma potansiyeli olan vücut sıvıları (tükürük ve balgam) içeren gri suyun ise önemli bir SARS-CoV-2 iletim aracı olması beklenmemektedir<sup>(8,43)</sup>. Gri su genellikle SARS-CoV-2'nin duyarlı olduğu deterjanlar, sabunlar ve çeşitli dezenfektanları içerdiğinden, virüs konsantrasyonunun düşük olması beklenmektedir.

### SARS-CoV-2 Saptanması ve Bulaşıcılığı

Atık suda virüs belirlenmesi ve izlenmesi kalitatif, genomik kantifikasyonun yanı sıra kültüre-edilme metodu olan *in vitro* plak oluşum ünitesi (PFU) sayımı olarak sıralanabilir. Moleküler yaklaşımların hedefi, su örneğinde SARS-CoV-2 ssRNA varlığının tahmini ve ssRNA kopyasının (veya fragmanı) bağlı bolluğu hakkında bilgi vermek olabilir, ancak bu yöntemler ile viral enfeksiyon ölçülemez<sup>(47)</sup>. PFU, enfektif virionların nicel bir tahminini sağlayabilir, ancak virüsü *in vitro* üretmek için uygun bir konakçı gerektirdiğinden bu yöntem yavaş ve zordur<sup>(47,48)</sup>. Genellikle atık su örneklerinde bulunan toksinlerin sitotoksik etkisi, viral saptanması için plak oluşum ünitesi testinin duyarlılığını daha da sınırlandırılabilir<sup>(49-51)</sup>. Ek olarak, enfektif virionları izole etmek için ssRNA belirlenmesine kıyasla virüs konsantrasyonlarının daha da yüksek olması gerekir (>10<sup>6</sup> kopya mL<sup>-1</sup>). Bu nedenle, hastanelerin atık sularının SARS-CoV ssRNA için pozitif olarak test edilmesi, ancak enfektif virionlar için test edilmemesi şaşır-

tıcı değildir<sup>(8)</sup>. Ancak, dezenfektanların ve çeşitli sürfaktanların yoğun kullanımı nedeniyle hastane atık suyundaki enfektif virion konsantrasyonunun saptama limitinin altında olması da olasıdır.

Kullanılan yöntemlerden bağımsız olarak, SARS-CoV'lerin atık sudaki saptanması ve sayımı, insan dışkı üzerindeki doğrudan testlere göre seyreltme sonrası düşük bağıl bollukları ( $10^1$  ila  $10^6$  kopya  $L^{-1}$ ) nedeniyle oldukça zordur<sup>(11,41,44,52)</sup>. Bu nedenle, numuneyi yüksek geri kazanım oranlarıyla konsantre etmek gereklidir<sup>(51)</sup>. Yakın zamanda yayınlanmış umut verici konsantrasyon yöntemleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Bozulmamış virionlar, kırık virionları uzaklaştırmak için enzim işleminden sonra karşılık gelen reseptörlerle kaplanmış hücresiz substrat üzerinde konsantre edilebilir<sup>(77)</sup>. Bağlı virionlar, daha sonra RT-qPCR ile analiz edilebilir<sup>(77)</sup>. Son zamanlarda, bu yöntemin atık suda özel ekstraksiyon yöntemlerinden sonra SARS-CoV-2'yi saptadığını ve ölçtüğünü belirtmektedir<sup>(13,41,53)</sup>. Aktif çamurdan yapılan bir transkriptom (ssRNA) analizi, diğer moleküler tekniklerde keşfedilemeyen çok çeşitli kültüre edilmemiş bakteri virüslerini ortaya çıkarmıştır<sup>(78)</sup>. Düşük viral konsantrasyonlar çeşitli konsantrasyon yaklaşımları gerektirecek olsa da uygun teknikler ile atık sudaki SARS-CoV-2 gibi tek sarmallı ssRNA virüslerinin saptanması için yeni bir yaklaşım sağlayabilir.

Hem bağıl bolluk hem de viral enfeksiyon, hastalığın bulaşması için kritik faktörlerdir. Bununla birlikte, ekstraksiyon protokollerinde, kapsidi çevreleyen lipid tabakalı çift zar kolayca bozulduğundan, bozulmamış virüsler için genellikle düşük geri kazanım oranlarına yol açar<sup>(47,79)</sup>. Bu nedenle, atık sudaki enfektivitesini belirlemek için başka yaklaşımlar geliştirilmelidir. Şu anda, SARS-CoV-2'nin (yani bir enfeksiyona neden olan viral partikül sayısı) insanlar için minimum bulaşıcı dozu (MID) bilinmemektedir<sup>(6)</sup>. Yine de hastalığın hızlı yayılması, MID'nin düşük olduğunu ve diğer zarflı virüslere benzer olduğunu göstermektedir<sup>(80-82)</sup>.

**Su ve Atık Su Matrislerinde SARS-CoV-2 Stabilitesi**  
Virüslerin yaşamda kalma süresi genellikle üsteldir ve yarılanma ömrü (iki kat azalmak için gereken süre)

olarak, log giderimi veya %90 inaktivasyona (T90) ulaşmak için gereken süre olarak rapor edilir. Çeşitli çevresel koşullar altında, SARS-CoV-2 virionları ve diğer zarflı virüslerin birkaç gün boyunca enfektivitesi devam edebilmektedir. Su ve atık sudaki SARS-CoV bulaşıcılığını etkilediği bilinen faktörler arasında sıcaklık, organik içerik ve çözeltinin pH'ıdır<sup>(51,83,84)</sup>. Sıcaklık, genel olarak virionların ve özel olarak SARS-CoV-2'nin yaşamda kalması için önemli bir değişkendir. Daha düşük sıcaklıklarda SARS-CoV'lerin bulaşıcılığının daha uzun süre tutulduğu gözlemlenmiştir (Örneğin, atık suda 4°C'de 14 gün ve 25°C'de iki gün)<sup>(51)</sup>. Hindistan'da atık suda 45°C gibi yüksek ortam sıcaklıklarında viral genomun varlığı saptanmıştır<sup>(64)</sup>. Bu, soğuk mevsimlerde ve ılıman iklim bölgelerinde, SARS-CoV-2'nin çevresel stabilitesinin artabileceği anlamına gelir. 56°C'nin üzerindeki sıcaklıklar, büyük olasılıkla proteinlerin ve çift katmanlı lipid tabakanın denatürasyonu nedeniyle 30 dakika SARS-CoV-2'yi güvenilir bir şekilde inaktive eder<sup>(83)</sup>. Su ve atık su numunelerinde organik madde konsantrasyonunun artışı CoV'lerin yaşamda kalma süresini azalttığı bildirilmiştir. Bu durumun nedeni, hücre dışı enzimatik aktivite yoluyla virüsleri inaktive edebilen antagonist bakterilerin varlığından kaynaklanıyor olabilir<sup>(85)</sup>. Ayrıca AAT'lerinde organik maddeler, SARS-CoV virionlarının zarfına spesifik olmayan bir şekilde adsorbe olarak onları oksidatif hasar, klorlama, ultraviyole (UV) radyasyon, protozoan veya metazoan avlanmasından koruyabilir<sup>(79,85)</sup>.

#### Atık Suda SARS-CoV-2 tanınması

Atık sudan SARS-CoV-2'nin konsantrasyonu, virüsün saptanma verimliliği<sup>(52)</sup>, analizlerin maliyeti, ölçeklenebilirlik ve tedarik zinciri virüs izleme çalışmalarındaki en büyük zorlukların başında yer almaktadır. AAT'lerden numune alma stratejisi, analiz sonuçlarını etkileyen en kritik adımlardan biridir Şekil 1.

Örneklerin temsili olabilmesi için anlık örnek yerine 24 saat kompozit numune alınması tercih edilmelidir<sup>(87)</sup>. Örneklem stratejisinde problem olabilecek konulardan biri biyo-belirteç olarak seçilen ve takip edilen kirleticilerin yarı ömürleridir. Biyo-belirteçlerin yarı ömürleri sıcaklığa bağlı olarak değiş-

Tablo 1. Atık suda SARS-CoV-2'nin konsantrasyon ve tanımlama yöntemleri<sup>(10-14,28,41,44,46,53-76)</sup>.

Ülke	Çevresel matris hacmi (ml)	Numune hacmi (ml)	Debris ve askıda katılardan virüsün saflaştırılması	Konsantrasyon & Ekstraksiyon metodu	Tanımlama metodu /CPE	Dizileme ile Doğrulama/Sürrogat, Pozitif Kontrol	Tanımlanma sıklığı	Maksimum konsantrasyon (genom kopya/L)
ABD/ Boston, MA <sup>41</sup>	HA	80	Filtrasyon- 0.22 µm PES membran	Presipitasyon: PEG 8000, NaCl & TRIzol™-kloroform RNA ekstraksiyonu, Santrifüj	RT-qPCR: CDC N1, N2, N3 /Hayır	Evet/PMMoV	10/10 (%100) N1: 4/6, N2: 1/6 N3: 4/6	>2 × 10 <sup>5</sup>
ABD/ Bozeman, MT <sup>46</sup>	HA	500	Ardışık filtrasyon- 20 µm, 5 µm, 0.45 µm	Ultrafiltrasyon: Corning® Spin-X UF & RNeasy Mini Kit ile RNA ekstraksiyonu	RT-qPCR: CDC N1, N2 /Hayır	Evet/PTC	13/17 (%100) N1: 13/17, N2: 13/17	>3 × 10 <sup>4</sup>
ABD/ New Haven, CT <sup>53</sup>	BÇ	2.5	Yok	RNeasy PowerSoil Total RNA Kit ile doğrudan RNA ekstraksiyonu	RT-qPCR: CDC N1, N2 /Hayır	Hayır/insan RP geni	44/44 (%100)	4.6 × 10 <sup>8</sup>
ABD/ Hampton, VA <sup>54</sup>	HA	125	Yok	Concentrating Pipette Select™- Elektronegatif filtrasyon, NucliSENS easyMag ile toplam nükleik asit ekstraksiyonu	RT-qPCR: N1, N2, N3 /Hayır	Hayır/BCoV, BRSV	98/198 (%49)	~ 10 <sup>5</sup>
ABD, Syracuse, NY <sup>55</sup>	HA, KS	20 20	Yok	Multiplikasyon Ultrasantrifüj: sükröz yastığı (TNE de %50 sükröz), Sorvall WX Ultra, AllPrep®PowerViral® DNA/RNA Kiti ve One-Step Multiplex RT-qPCR ile toplam nükleik asit ekstraksiyonu Ultrafiltrasyon: Centricon® Plus-70 ve/veya Elektronegatif membran 0.45µm-doğrudan RNA ekstraksiyonu <sup>a</sup>	RT-qPCR: IP2, IP4/Hayır	Hayır/crAssphage	18/22 (%82)	1.7 × 10 <sup>5</sup>
ABD/ Louisiana <sup>56</sup>	HA, IAC, ÇA,	250 250 250	Santrifüj	Ultrafiltrasyon: Centricon® Plus-70 ve/veya Elektronegatif membran 0.45µm-doğrudan RNA ekstraksiyonu <sup>a</sup>	RT-qPCR: CDC N1, N2/Hayır	Hayır/Pseudomonas bakteriofaji Φ6/2.0×10 <sup>5</sup> kopya/µL	HA: 2/15 (%13) ÇA: Negatif Sonuç	7.5 × 10 <sup>3</sup>
Almanya <sup>57</sup>	HA, ÇA	Belirtilmemiş	Santrifüj	Ultrafiltrasyon: Amicon® Ultra-15, NucleoSpin RNA Virus kit	RT-qPCR: E, M, N, RdRp/Caco-2	Evet/SARS-CoV-FMM1/HCoV-229E	HA: 9/9 (100%) AÇ: 4/4 (100%)	HA: 2.0 × 10 <sup>4</sup> AÇ: 3.7 × 10 <sup>4</sup>
Avustralya/ Brisbane Queensland <sup>10</sup>	HA	100-200	Yok	Elektronegatif membran 0.45µm -doğrudan RNA ekstraksiyonu; Ultrafiltrasyon: Centricon® Plus-70 & RNeasy PowerWater Kit ve RNeasy PowerMicrobiome Kit, RNeasy PowerWater Kit	RT-qPCR: N_Sarbeco, NIID_2019-nCoV_N /Hayır	Evet/gBlocks gen, murine hepatitis virus (MHV)	2/9 (%22)	1.2 × 10 <sup>3</sup>

Tablo 1. (devam).

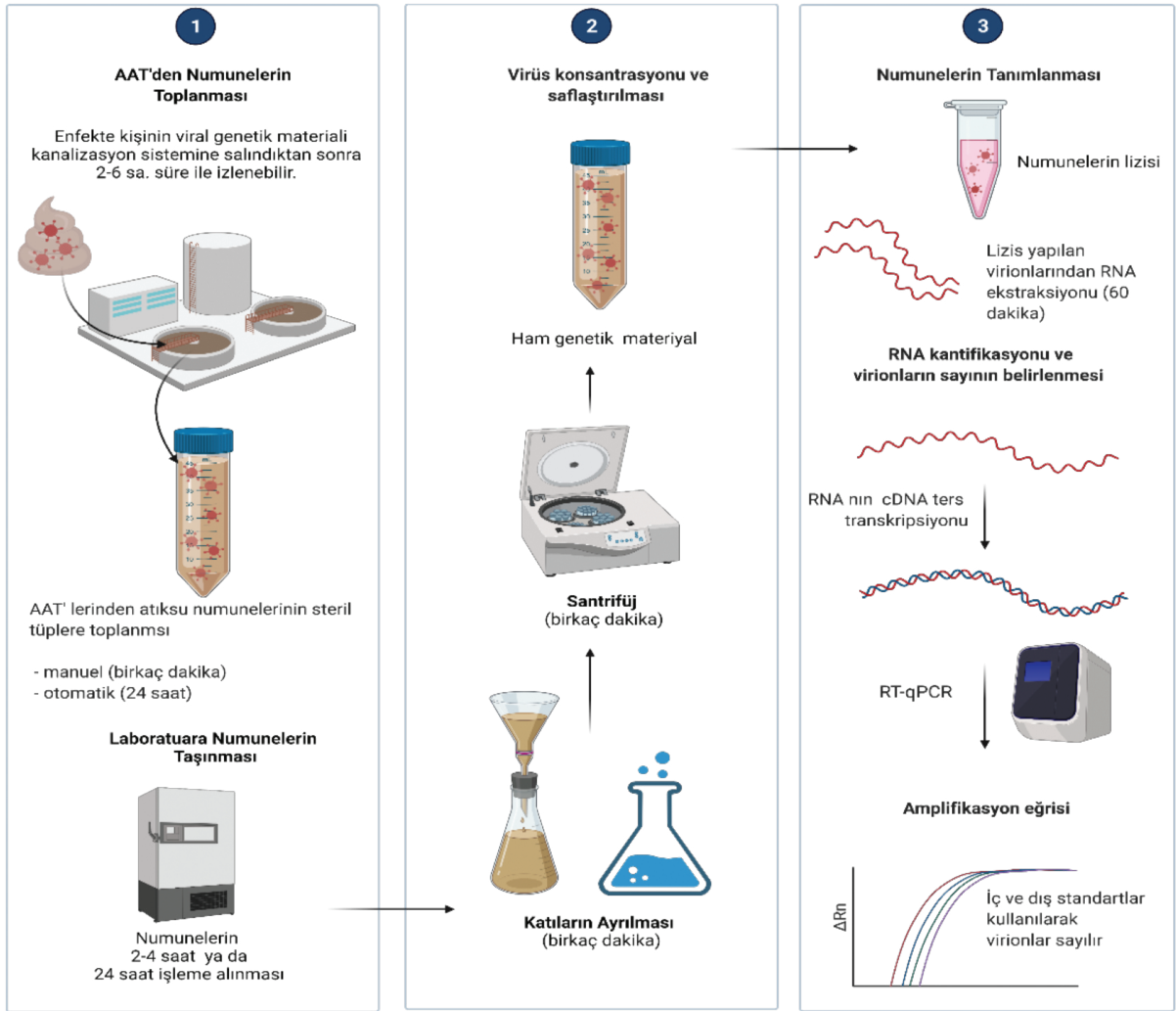
Brezilya/ Florianópolis Santa Catalina <sup>58</sup>	HA	25	Santrifüj, ultrasantrifüj, Lizin tampon metodu, Presipitasyon: PEG	Filtrasyon ve Santrifüj & QIAamp® Viral RNA Mini kit	RT-qPCR: N1, E_Sarbeco, RdRp/ Hayır	Hayır/MNV-1	4/6 (66%)	5 × 10 <sup>6</sup>
Brezilya/ Niterói Rio de Janeiro <sup>59</sup>	HA	Belirtilmemiş	Yok	Ultrasantrifüj, & QIAamp® Viral RNA Mini kit	RT-qPCR: N1, N2, N3/ Hayır	Hayır	5/12 (41.6%)	Rapor edilmemiş
Çek Cumhuriyeti <sup>60</sup>	HA	500	Yok	Sığır özütlü çözeltisi ve santrifüj kullanarak doğrudan flokülasyon, NucliSENS® miniMAG®	RT-qPCR: N, S/Hayır	Hayır/7GEV	13/112 (11.6%)	Rapor edilmemiş
Ekvador Cumhuriyeti/ Quito <sup>61</sup>	Kentsel Akarsu	Belirtilmemiş	Yok	Yağsız süt flokülasyonu, & AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit	RT-qPCR: CDC N1, N2/Hayır	Hayır/İnsan Adenovirüsü	3/3 (%100)	~10 <sup>4</sup>
Fransa/Paris <sup>44</sup>	HA	Belirtilmemiş	Yok	Ultrasantrifüj & PowerFecal Pro kit, OneStep PCR inhibitor removal kit	RT-qPCR: E_Sarbeco, RdRp/Hayır	Hayır	Rapor edilmemiş (%100)	~10 <sup>6</sup>
Fransa/ Montpellier <sup>62</sup>	HA	Belirtilmemiş	Yok	Filtrat ultrasantrifüjü	RT-qPCR: CDC N1, N3, RLP27	Rapor edilmemiş	Rapor edilmemiş	Rapor edilmemiş
Hindistan/ Ahmedabad, Gujara <sup>63</sup>	HA, ÇA	50	Santrifüj, Filtrasyon: 0.22 µM	Filtratın PEG 9000 + NaCl presipi- tasyonu, Santrifüj & NucleoSpin® RNA Virus kit	RT-qPCR: ORF1ab, N, S/Hayır	Hayır/MS2 faji	HA: 2/2 (100%) ÇA: 2/2 (Negatif Sonuç)	HA: 3.5 × 10 <sup>2</sup> ÇA: Negatif sonuç
Hindistan <sup>64</sup>	HA, AÇ	Belirtilmemiş	Filtrasyon: 0.45 µM	PEG/dextran metodu ile ayırma ve ultrasantrifüj & Alplex™ 2019-nCoV Assay kit	RT-qPCR: ORF1ab, RdRp, N, S, E_Sarbeco/Hayır	Hayır/İÇ, MS2	HA: 5/8 (62.5%) AÇ: 0/5	Rapor edilmemiş
Hollanda/ Amsterdam, Lahey, Utrecht, Apeldoorn, Amersfoort, Schiphol, Tilburg <sup>65</sup>	HA	250	Santrifüj	Süpermatant Ultrafiltrasyonu: Centricon® Plus-70 & RNeasy PowerMicrobiome Kit, Biomerieux Nuclisens kit	qPCR: CDC N1, N2, N3, E_Sarbeco/Hayır	Hayır/İÇ, MS2	19/24 (79%) N1: 18/24, N2: 18/24, N3: 19/24 E: 18/24	2.2 × 10 <sup>5</sup>
İngiltere <sup>65</sup>	HA	120-240	Filtrasyon-Santrifüj	500 mL Nalgene Rapid-flow™ 0.45µM filtre, Centriprep santrifüj filtre, Step One Plus real-time PCR system	RT-qPCR: RdRp, E_Sarbeco/Hayır	Evet	3/5 (60%)	3.1–15.8 × 10 <sup>3</sup>

Tablo 1. (devam).

İsrail <sup>66</sup>	HA, AÇ	250-1000	Santrifüj	Süpernatant presipitasyonu: PEG veya Alüminyum hidroksit adsorpsiyonu, santrifüj, 0.22µM filtre, Ultra-15 santrifüj tüpleri & RNeasy mini kit- QIAGEN ve EasyMAG, Step One Plus real-time PCR system	RT-qPCR: E_Sarbeco/Hayır	Hayır/BGI kit	10/26 (42%)	Rapor edilmemiş
İspanya/ Valensia <sup>67</sup>	HA, ÇA, Üçüncül Aritma	200	Adsorpsiyon - presipitasyon: Al(OH) <sub>3</sub>	NucleoSpin RNA virus kit, Plant RNA Isolation Aid & UltraSense One-Step Kit, One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit	RT-qPCR: CDC N1, N2, N3/Hayır	Hayır/ PEDV/MgV (5 log <sub>10</sub> PCR units, PCRU)	HA: 35/42 (83%) ÇA: 2/18 (%11) Üçüncül Aritma: 0/12	3.4 x 10 <sup>5</sup>
İspanya/ Valensia <sup>11</sup>	HA, ÇA	200	Adsorpsiyon- presipitasyon: Al(OH) <sub>3</sub>	Santrifüj & NucleoSpin RNA virus Kit, UltraSense One-Step Kit	RT-qPCR: CDC N1, N2/Hayır	Hayır/MgV (5 log <sub>10</sub> PCR units, PCRU)	HA: 13/15 (87%)	1.0 x 10 <sup>5</sup>
İspanya <sup>68</sup>	HA, AÇ, ÇA	100	Santrifüj	Ultrafiltrasyon: Amicon, Presipitasyon: PEG, Santrifüj, PES membran: 0.45µM PEG 8000 ve NaCl, Santrifüj & STARMag 96 x 4 Universal Cartridge Kit ile nükleik asit ekstraksiyonu, One Step multiplex RT-qPCR Allplex system™	RT-qPCR: RdRp, N, E_Sarbeco/Hayır	Hayır/ik: CFX96 system™, MS2	HA: 8/8 (%100) AÇ: 11/32 (%34) ÇA: 0/8	HA: 1.50 x 10 <sup>4</sup> AÇ: 4.00 x 10 <sup>4</sup>
İspanya/ Barselona <sup>69</sup>	HA	800	Presipitasyon: PEG 6000	NucliSENS® miniMAG® extraction system ile nükleik asit ekstraksiyonu, UltraSense(tm) One-Step Quantitative RT-PCR System	RT-qPCR: RdRp, IP2, IP4, E_Sarbeco, N1, N2/Hayır	Hayır/Twist SARS-CoV-2 RNA Control 2	1/19 (11%)	8.3 x 10 <sup>2</sup>
İtalya/ Milan ve Roma <sup>12</sup>	HA	250	Santrifüj, Presipitasyon: PEG/ dextran WHO metodu, Ayrırma hunisi	NucliSENS miniMAG yarı otomatik ekstraksiyon sistemi, OneStep PCR Inhibitor Removal Kit	RT-qPCR: ORF1ab, RdRp, S/Hayır	Hayır	6/12 (50%)	4.1 x 10 <sup>3</sup>
İtalya/Milano, Turin, Bolonya <sup>28</sup>	HA	250	Santrifüj, Presipitasyon: PEG/ dextran WHO metodu, Ayrırma hunisi	NucliSENS miniMAG yarı otomatik ekstraksiyon sistemi, OneStep PCR Inhibitor Removal Kit	RT-qPCR: ORF1ab, RdRp, E_Sarbeco/Hayır	Hayır/HCoV 229E	15/40 (37%)	5.6 x 10 <sup>4</sup>
İtalya/Milano, Monza <sup>70</sup>	HA, ÇA, Nehir	1000	Cam Filtre: 0.7 µM Nitsoselüloz filtre- 0.22 µM (50 ml ön filtrat)	QIAMP Viral RNAmini kit	RT-qPCR: 2019-nCoV, ORF1ab, N, E_Sarbeco/ Hayır	Evet/ Evet/	HA: 3/4 (%75) ÇA: 0/2 Nehir: 2/2	Rapor Edilmemiş

Tablo 1. (devam).

Japonya/ Yamanshi Prefecture <sup>14</sup>	HA: 200 AÇ: 5000 Nehir: 4000	Selüloz-ester filtre-0.8 µM, Santrifüj, Membran filtre-0.45 µM, CentriprepYM-50 Ultrafiltrasyonu	Elektronegatif membran-vorteks (EMV) metodu veya/ ve doğrudan adsorpsiyon ile RNA ekstraksiyon yöntemi (Selüloz-ester filtre- 0.8µM), QIAamp Viral RNA Mini Kit, RNeasy PowerWater Kit	RT-qPCR: N_Sarbeco, NIID_2019-nCoV_N, CDC-N1, N2, ORF1a, S, PMMoV RT-qPCR: ORF1ab, N/Hayır	Hayır/ PMMoV	HA: 0/5 AÇ: 1/5 (%20) Nehir: 0/3	HA: Tespit edilememiş AÇ: 2.4 x 10 <sup>3</sup> Nehir: Tespit edilememiş
Pakistan <sup>71</sup>	HA	Vorteks, Santrifüj	Hero 32 ekstraksiyon sistemi	RT-qPCR: ORF1a, N/Hayır	Hayır	16/28	Rapor Edilmemiş
Pakistan <sup>72</sup>	HA	Santrifüj	PEG/dextran WHO metodu, Ayrırma hunisi, santrifüj/Spin star viral nükleik asit kit & qRT PCR for Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit QIAamp Viral RNA Mini kit,	RT-qPCR: ORF1a, N/Hayır	Hayır	21/78 (27%)	Rapor Edilmemiş
Şili <sup>73</sup>	HA, AÇ	Ultrasantrifüj	TaqMan 2019-nCoV Assay Kit	RT-qPCR: ORF1, N, S/Hayır	Hayır	HA: 4/4 (100%)	HA: 4.8 x 10 <sup>3</sup> AÇ: 1.6 x 10 <sup>2</sup>
Türkiye/ İstanbul <sup>74</sup>	HA, KS	Ultrafiltrasyon: Amicon, Santrifüj, Ardışık filtrasyon (0.45 µm, 0.22 µm filtre)	Presipitasyon-flokülasyon: PEG 8000 + Dextran & The QIAamp cadör Pathogen Mini Kit	RT-qPCR: RdRP /Hayır	Hayır/IBV/300 µl/105	5/7 (%71)	HA: 1.80x10 <sup>4</sup> KS: 9.33x10 <sup>4</sup>
Türkiye/ İstanbul <sup>75</sup>	ÇA	Santrifüj, Ardışık filtrasyon (0.45 µm, 0.22 µm filtre)	Presipitasyon-flokülasyon: PEG 800 + Dextran & Roche MagNA pure LC toplam nükleik asit izolasyon kiti	RT-qPCR: RdRP/Hayır	Hayır/IBV/300 µl/105	9/9 (%100)	AC: 4.02x10 <sup>4</sup> genom kopya/L
Türkiye/ Marmara, Ege, ÇA, Anadolu, BC, Akdeniz, AAÇ Karadeniz, Doğu Anadolu Bölgeler <sup>76</sup>	HA, ÇA, BC, AAÇ	Santrifüj, Ardışık filtrasyon (0.45 µm, 0.22 µm filtre)	Presipitasyon-flokülasyona: PEG 800 + Dextran & Roche MagNA pure LC toplam nükleik asit izolasyon kiti	RT-qPCR: N1, N2/Evet	Hayır/IBV/300µl/ 105	HA-177 (%85), CA-167 (%87), BC: 35 (%91), AAÇ-122 (%87), CPE: 1/31 (%3.2)	8E+3-8E+6 virüs titre/L



Şekil 1. Kentsel atık sularda SARS-CoV-2 RNA varlığının saptanması<sup>(86)</sup>.

mektedir. SARS-CoV-2'nin ortam koşullarında (20°C) yarı ömrü, 4.8 ve 7.2 saat arasında değiştiği tahmin edilmektedir<sup>(88)</sup>. Geriye dönük hesaplama yapılırken kirleticilerin yarı ömrü dikkate alınmalıdır. Diğer kritik önemi olan konu da yeterli virüs geri kazanımı için numune hacminin az olmamasıdır. Düşük virüs yükü yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Örneklerin analiz öncesi saklama sıcaklığı da sonuçların güvenilirliğini etkileyebilir. SARS-CoV-2'nin genetik materyalinin RNAaz tarafından bozulmasına<sup>(89,90)</sup> engel olmak için ham atık suyu depolamak yerine atık suyun konsantre edilerek -80°C'de depolamak tercih edilmelidir. Su örneklerinde virüslerin saptama sınırları iyileştirilmesi için konsantre edilmeleri gerekir. Su döngüsünde zarflı virüs tanımlamak için kanıtlanmış bir metot bulunmamaktadır. Var olan metotların çoğu

zarfsız enterik virüsler için optimize edilmiştir<sup>(91)</sup>. Virüs konsantrasyonunda, çeşitli pH aralıklarında eklenen kimyasallar ile ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon, adsorpsiyon ve elüsyon (VIRADEL), koagülasyon, boyut dışlama ve flokülasyon gibi yöntemler genellikle tek başına veya kombinasyon hâlinde kullanılmasına odaklanılır<sup>(70,92)</sup>. Atık sudan SARS-CoV-2'nin geri kazanım verimliliği hakkında çok az şey bilinmektedir. Zarflı SARS-CoV-2'nin geri kazanım etkinliğinin zarfsız enterik virüslerden farklı olabileceği öne sürülmüştür<sup>(6,47)</sup>. Son çalışmalarda, ham atık sudan SARS-CoV-2 partiküllerini/genomlarını geri kazanmak için çeşitli virüs konsantrasyon yöntemleri kullanılarak<sup>(13)</sup> orta hızda santrifüjleme (100kDa Centricon®Plus-70) yöntemleri denenmiştir. Ahmet ve ark.<sup>(52)</sup> elektronegatif membran, Centricon®Plus-70



santrifüj ve ultrafiltrasyon kullanılarak adsorpsiyon-ekstraksiyon yöntemini uyguladılar. Bununla birlikte, santrifüj filtrelerinin maliyeti ve bulunabilirliği, özellikle pandemi sırasında tedarik zincirinin aksaması olasılığı göz önüne alındığında, bazı laboratuvarlar için sınırlı olabilir. La Rosa ve ark.<sup>(28)</sup> 2003 WHO Poliovirüs Çevresel Sürveyans Kılavuzu'nda açıkladığı gibi iki aşamalı (PEG-dekstran) ayırma yöntemi kullandı ve İtalya'daki 12 atık su örneğinden altısının SARS-CoV-2 için pozitif test ettiğini bildirilmiştir. Atık sularda SARS-CoV-2 ssRNA'nın saptanması için alüminyum kaynaklı flokülasyon yöntemi ve ardından nükleik asit ekstraksiyonu kullanılmıştır<sup>(11)</sup>. Ahmet ve ark.<sup>(52)</sup> ham atık su örneklerinde Murin Hepatit Virüsünü (MHV) ile yedi konsantrasyon yöntemi değerlendirerek ortalama MHV geri kazanımları rapor edilmiştir<sup>(52)</sup>. Wu ve ark.<sup>(41)</sup>, çok az özel ekipman gerektiren belki de en ölçeklenebilir yöntemi önerilmiştir; 0.2 mikronluk filtrat PEG ile floküle edilerek saflaştırılmış RNA elde etmek Trizol™ ile ekstrakte edildi. Rapor edilen en basit prosedürler arasında, ekipmanın var olduğunu olduğu varsayılarak, küçük hacimlerde (11 mL) atık suyun bir saat boyunca ultrasantrifügasyonu ve ardından peletten nükleik asitlerin elde edilmesi yer almaktadır<sup>(44)</sup>. Hücre kültürüne adapte edilmiş SARS-CoV-2 suşu veya çeşitli yöntemlerle konsantre edilen ham ve çıkış atık suyunda pozitif numuneler ile tanımlama sınırları oluşturulmalıdır. Bununla birlikte, SARS-CoV-2'yi analiz etmek için bir BSL3 laboratuvar tesisinin gereksinimi, bu deneyin ana sınırlamasını oluşturmaktadır.

Atık sudaki SARS-CoV-2 saptanması ABE amaçları için işlevsel olsa da insan sağlığı ile ilişkili su döngüsündeki viral partiküllerin enfektivitesi hâlâ şüphelidir ve fekal-oral geçiş potansiyeli doğrulanmayı gerektirmektedir. Bazı araştırmacılar, su örneklerinde çok sayıda ssRNA kopyasına rağmen, SARS-CoV-2'nin hücre kültürü çalışmalarındaki başarısızlık göz önüne alındığında, atık su ve nehirden enfeksiyon riskinin ihmal edilebilir olduğunu ileri sürmektedir<sup>(70)</sup>.

### Atık Su Arıtma Tesisleri

Atık su arıtma tesislerinde (ATT) yüksek konsantrasyonda ve çeşitlikte olan virionlar, çoklu-bariyer (fizik-

sel, biyolojik ve kimyasal proseslerle) zincirinden geçerek büyük ölçüde giderilebilmektedirler<sup>(27,93)</sup>. Doğadaki virüslerin mühendislik sistemleri ile giderilmeden yaşamda kalması, halk sağlığını etkileyecek önemli risklerin başında yer almaktadır. Bu nedenle, su arıtımı sırasında enterik virüslerin giderilmesi veya 4 log (%99.99) inaktive edilmesi gerekmektedir<sup>(94)</sup>. AAT'lerde atık su ilk olarak virüslerin yalnızca sedimentasyon yoluyla uzaklaştırılmasının düşük olduğu birincil arıtmaya tabi tutulur. Dezenfeksiyondan önce sedimentasyon ve kum filtrasyonu virüsün giderilmesine önemlidir<sup>(95,96)</sup>. Koagülasyon ve ardından kum filtrasyonu, virüs giderme kapasitesini arttırmaktadır<sup>(97)</sup>. Organik partiküllere virüslerin sorpsiyonu ve çöktürülerek uzaklaştırılması, ikincil (biyolojik) arıtma adımlarında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. SARS-CoV-2 için henüz belirli bir veri bulunmamasıyla birlikte, atık sudaki zarflı virüslerin<sup>(79)</sup> zarfsız virüslere göre kıyasla askıda katı maddelerdeki partiküllere adsorbe olarak giderilmesi daha olasıdır<sup>(49)</sup>. Aktif çamur flokları ve katıların ayrılması virüslerin yok edilmesine büyük ölçüde katkıda bulunur. İkincil biyoreaktörlerde konsantre bakteri konsorsiyumunda bulunan hidrolazlar ve proteazlar gibi hücre dışı enzimlerin de SARS-CoV'leri inaktive etmesi olasıdır<sup>(79,98,99)</sup>. Fiziksel süreç (sedimentasyon ve filtrasyon) ve biyolojik süreç (Aktif Çamur Prosesi), enfektif virüsleri inaktive etmeden sıvı fazdan katı faza ayrılmasına/aktarılmaya neden olur. Bu nedenle, virüslerin çeşitli yollardan potansiyel bulaşma riski vardır<sup>(100)</sup>. Termofilik çürütme (50-75°C), kireç ilavesi, mekanik dehidrasyon/kurutma (virüs kapsid kırılması), kompostlama süreci (sıcaklık ve antagonistik organizmalar) ve mezofilik anaerobik çamur çürütme gibi çamur stabilizasyon süreçlerinin uygulamalarında viral inaktivasyon yeteneği görülmüştür<sup>(90,100-102)</sup>. Arıtma sürecinde SARS-CoV, çevresel koşullar ve mikrobiyal antagonizma nedeniyle inaktivasyonunu sağlayan uygulamalar umut verici uygulamalardır. Bununla birlikte, gübreleme sırasında tarımsal amaçlar için kullanılacak atık çamurlarında aerosol kontrolü uygulanmalıdır. Arıtılmış atık suyun dezenfeksiyonu, güvenilir SARS-CoV-2 inaktivasyonunu sağlamak için önemli adım olabilir. Mekanizmalar net olmasa da SARS-CoV'ler gibi zarflı virüsler, zarfsızlara göre klor bazlı dezenfektanlara daha duyarlı olma eğili-

mindedir. Fakat eğer çevresel matrislerde organik madde içeriği yüksek ise SARS-CoV-2, dezenfektanlara daha az duyarlı olabilir. Enfektif enterik virüslere dezenfekte edilmiş ikincil arıtma çıkışında da rastlanmıştır<sup>(103-105)</sup>. Pandemi sırasında, ham atık sudaki viral yükler normalden daha yüksek olduğundan, yetersiz viral uzaklaştırma (özellikle dezenfektan dozları arttırılmazsa) suyun yeniden kullanımı yoluyla viral bulaşmaya neden olabilir. Yeniden kullanımı olan atık sular için bazı ülkeler deşarj öncesi üçüncül arıtma uygulamaktadır. Üçüncül arıtma, mikrobiyal patojenlerin daha iyi uzaklaştırılmasını sağlamak için kum filtrasyonu, akifer reşarji, UV radyasyonu, ileri oksidasyon prosesleri (foto-kataliz, soğuk plazma, fenton prosesi, ultrason, nano-kataliz bazlı oksidasyon) ve/veya membran teknolojilerini içerebilir. Oksidanlar ve radyasyon, spesifik olmayan viral proteinlere ve nükleik asitlere zarar verir, ancak spesifik virüs fonksiyonlarının kaybının (konak tanıma/bağlanma, genom enjeksiyonu/replikasyonu) anlaşılması önemlidir<sup>(106)</sup>. UV<sub>254</sub>, singlet oksijen ve hipokloröz asit, genomun güvenilirliğini inhibe ederken, ClO<sub>2</sub> ve ısı uygulamaları, konak hücre tanıma/bağlanma bölgesini inhibe eder. ClO<sub>2</sub> genom fonksiyonlarını bozmadan ClO<sub>2</sub> proteinleri bozarak inaktivasyon sağlar<sup>(106)</sup>. Protein seviyesinde ClO<sub>2</sub> seçici oksidandır ve Cys, Trp ve Tyr ile reaksiyona girer<sup>(107)</sup>. UV ışınlanması ve klor ile arıtma ile site-spesifik kapsit proteinini omurga bölünmesine neden olarak hem genom replikasyonunun hem de genom enjeksiyonunun inhibisyonu meydana gelir<sup>(106)</sup>. UV<sub>254</sub> uygulaması, insan norovirüs ve enterik (+) ssRNA virüsleri (*Echovirus 12* ve *Feline calicivirus*) için benzer duyarlılık göstermiştir ve protein hasarına bağlı olarak virüs inaktivasyonunun %60'ını oluşturan genom işlevselliğinde kayıp meydana geldiği bildirilmiştir<sup>(108)</sup>. UV<sub>254</sub> radyasyonun viral genom<sup>(94)</sup> ile reaksiyonlar yoluyla SARS-CoV-1'e<sup>(109,110)</sup> karşı da etkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, gerekli doz (ışın ve zamanın bir fonksiyonu), virüs ve ortam ile ilgili birçok faktöre (yani organik madde konsantrasyonu) bağımlıdır ve geniş bir aralıkta değişir<sup>(110)</sup>. İkincil arıtma çıkışı suyunun ozon bazlı arıtımı, ozon tarafından DNA veya RNA saldırısı<sup>(111)</sup> yoluyla veya serbest radikaller<sup>(112)</sup> oluşturarak virüsleri etkin bir şekilde etkisiz hâle getirdiği bilinmektedir. Klorlamaya benzer şekilde,

oksidasyon kapasitesinin arka plandaki bileşenler tarafından önemli ölçüde uzaklaştırılması ve zararlı dezenfeksiyon yan ürünlerinin oluşması olasıdır. Bugüne kadar, SARS-CoV-2 inaktivasyonu için bu dezenfeksiyon işlemlerinin etkinliği bilinmemektedir ve araştırmaya gereksinim vardır. Fonksiyonel genom hasarını hedefleyen ileri ve entegre prosesler, çeşitli viral patojenler için daha iyi yöntemler geliştirmesine yardımcı olacaktır<sup>(106)</sup>.

## SONUÇ

Kılıflı βCoV ailesine ait ve ssRNA sahip CoV kaynaklı salgınlar, son yirmi yılda artış göstererek 2019 yılında SARS-CoV-2 (2019) küresel salgın olarak ortaya çıkmıştır<sup>(113)</sup>. Şimdiye kadar elde edilen veriler, insan GI kanalında SARS-CoV-2'nin replikasyonunun ve kalıcılığının kanıtlandığını göstermektedir. Belirti göstermeyen bireyler dâhil dışkı ile virüsün çevre matrisine atılması, fekal-oral yoldan bulaşma olasılığının arttırmaktadır<sup>(114,115)</sup>. SARS-CoV-2'yi etkili bir şekilde kontrol etme stratejisi, yalnızca belirti gösteren olguların tanımlanmasına ve izole edilmesine dayanmak yerine hastalık belirtisi yokluğunda bulaşma riskini de ele alan birden fazla önleme gereksinim vardır<sup>(115)</sup>. Bu kapsamda, atık su bazlı epidemiyoloji sürveyansı geliştirmek belirti göstermeyen olguların da tahmini hakkında daha doğru bilgi verecektir.

Kanalizasyon sistemlerinde SARS-CoV-2 sürveyansı için GI belirtilerle ilişkili atık su mikrobiyomunu oluşturan başlıca bakteri topluluğunun indikatör olarak kullanılabileceğini gösteren kanıtlar<sup>(116)</sup> salgının yayılması ve yüksek riskli mutasyonların varlığı ile mücadelede önemli yeni indikatörleri oluşturmaktadır. AAT'lerdeki tüm SARS-CoV-2 virüs varyantlarının varlığının yeni nesil dizileme teknikleri ile belirlenmesi<sup>(117)</sup> gereksinimi vardır. Moleküler sürveyans araçları ile çeşitli SARS-CoV-2 mutasyonlarının bulaşma dinamiklerini belirlemek, virüs dolaşımının doğru ve düşük maliyetli bir haritasının oluşturulması bakımından önemlidir.

SARS-CoV-2 virionların enfeksiyöz dozda varlığı ve dışkı/atık sudaki kalıcılık süresi, halk sağlığı açısından daha fazla sayıda örnekle incelenmesi ve açıklanması

gereken önemli konulardır. COVID-19 prevalansı düşük olduğunda bile ssRNA virüsünün kanalizasyonda saptanması ve COVID-19'un bildirilen yaygınlığı ile SARS-CoV-2'nin konsantrasyonu arasındaki korelasyon, kanalizasyon sürveyanının popülasyondaki virüsün dolaşımını izlemek için hassas bir araç olabileceğini göstermektedir.

Gelecekte atık su bazlı epidemiyoloji yaklaşımına PCR teknolojisinin yeni teknolojik araçlarla -dijital PCR, CSRPP (CRISPR-powered systems), Lab-on-a-chip/FET (Point of Care ve Field-Effect Transistor) veya SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) biyosensörleri- birleştirilmesi beklenmektedir<sup>(118)</sup>.

Çevresel matrislerde enterik virüsler için uygun inaktivasyon/arıtma stratejilerini tasarlanması, SARS-CoV-2 yüküne göre yeniden kullanılacak atık su için AAT'lerde uygun dezenfeksiyon proseslerin kullanılması acil önemi olan gereksinimler arasındadır. Su döngüsünde SARS-CoV-2 taşınması ile ilişkili risklerin azaltılması önemli bilgi boşluklarının doldurulması ile olası olabilecektir. Çevre mühendisleri, mikrobiyologlar, halk sağlığı uzmanları, epidemiyologlar, biyostatikçiler aşağıdaki araştırma gereksinimlerini yanıtlamak için birlikte çalışmaktadır:

1. SARS-CoV-2 bulaşma yollarını (hava, su, toprak, yüzeyler) ve enfeksiyonu önlemenin yollarını nasıl tanımlarsınız?
2. Hastaların en bulaşıcı olduğu pencere dönemi nedir?
3. Su ve aerosoller yoluyla SARS-CoV-2'nin minimum bulaşıcı dozu nedir?
4. qPCR analizlerini tamamlayıcı metot olarak virüslerin kültüre edilme testleri ile enfektivitesinin belirlenmesi ve mutasyonlarını saptamak için dizileme teknolojilerinin birlikte kullanılması önemlidir. Çeşitli çevresel habitatlara göre virüs genom dizileme kriterleri neler olmalıdır?
5. Atık su mikrobiyomunda SARS-CoV-2 için indikatör teşkil edecek başlıca bakteriyel topluluklar nelerdir?
6. Suyun yeniden kullanımı ile ilişkili (rekreasyon, soğutma ve tarım) sistemlerde SARS-CoV-2'nin tatlı su habitatlarına getirdiği virüs yükü nedir?
7. Atık su, yeniden kullanılan sular ve içme suyunda

viral ssRNA fragmentlerini ölçen moleküler yaklaşımlar yerine virion analiz metotlarının duyarlılık sınırları nasıl geliştirilebilir?

Bu araştırma soruları, halk sağlığı uzmanlarını ve çevre mühendislerini kentsel su döngüsüne virüslerin girmesi ile meydana gelecek pandemilere hazırlamak için kritik öneme sahiptir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

## KAYNAKLAR

1. Peplow M. Developing countries face diagnostic challenges as the COVID-19 pandemic surges The Foundation for Innovative New Diagnostics is at the forefront of efforts to expand testing in low- and middle-income countries. C&EN. 2020;98:27. [https://cen.acs.org/analytical-chemistry/diagnostics/Developing-countries-face-diagnostic-challenges/98/i27] (Erişim tarihi: 28.07.2021)
2. Giri AK, Rana DR. Charting the challenges behind the testing of COVID-19 in developing countries: Nepal as a case study. Biosaf Health. 2020;2(2):53-6. https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.05.002
3. Gudbjartsson, DF, Helgason A, Jonsson H, et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. N Engl J Med. 2020;382(24):2302-15. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2006100
4. Pandey D, Verma S, Verma P., et al. SARS-CoV-2 in wastewater: Challenges for developing countries. Int J Hyg Envir Heal. 2021;231:113634. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113634
5. Arnaud CH. To monitor the health of cities' residents, look no further than their sewers. C&EN. 2018; 96:18. [https://cen.acs.org/environment/water/monitor-health-citiesresidents-look-further/96/i18?ref=search\_results] (Erişim Tarihi: 28.07.2021)
6. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, et al. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. Sci Total Environ. 2020;139076. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076
7. Hellmér M, Paxéus N, Magnus L, et al. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. Appl Environ Microbiol. 2014;80(21):6771-81. https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14

8. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-69. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
9. Zhang H, Kang Z, Gong H, et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCoV infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. *bioRxiv*. 2020;2020.01.30.927806. <https://doi.org/10.1101/2020.01.30.927806>
10. Ahmed W, Angel N, Edson J, et al. First confirmed detection of SARSCoV- 2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ*. 2020;728:138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
11. Randazzo W, Cuevas-Ferrando E, Sanjuán R, Domingo-Calap P, Sánchez G. Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 epidemiological surveillance. *Int J Hyg Environ*. 2020;230:113621. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113621>
12. La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ*. 2020;736:139652. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>
13. Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ Sci Technol Lett*. 2020;7(7):511-6. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>
14. Haramoto E, Malla B, Thakali O. First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 ssRNA in wastewater and river water in Japan. *Sci Total Environ*. 2020;737:404-5. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35057>
15. Bivins A, North D, Ahmad A, et al. Wastewater-based epidemiology: global collaborative to maximize contributions in the fight against COVID-19. *Environ Sci Technol*. 2020;54(13):7754-7. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02388>
16. Hempel, S. John Snow. *Lancet*. 2013;381(9874):1269-70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60830-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60830-2)
17. Daughton CG. (2001). Illicit drugs in municipal sewage: Proposed new nonintrusive tool to heighten public awareness of societal use of illicit-abused drugs and their potential for ecological consequences. In: *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*; ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC, 2001:348-64.
18. Sewage Analysis CORE group Europe (SCORE). [<https://score-cost.eu/>] (Erişim tarihi: 28.07.2021)
19. COVID-19 WBE Collaborative. [<https://www.covid19wbec.org/>] (Erişim tarihi: 28.07.2021)
20. Venkatesan AK, Halden RU. Wastewater treatment plants as chemical observatories to forecast ecological and human health risks of manmade chemicals. *Sci Rep*. 2014;4(1):1-7. <https://doi.org/10.1038/srep03731>
21. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) advice for the public Geneva: World Health Organization, 2020. [<https://www.who.int/emergencies/diseases/novelcoronavirus-2019/advice-for-public>]. (Erişim tarihi: 28.07.2021)
22. WHO. Transmission of SARSCoV-2: implications for infection prevention precautions. World Health Organization, 2020. [<https://www.who.int/publications/i/item/modes-oftransmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>]. (Erişim tarihi: 28.07.2021)
23. Amirian ES. Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: current evidence and implications for public health. *Int J Infect Dis*. 2020;95:363-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.057>
24. Xu Y, Li X, Zhu B, et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat Med*. 2020;26(4):502-5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0817-4>
25. Zhang Y, Cao C, Shuangli Z, et al. Isolation of 2019-nCoV from a stool specimen of a laboratory-confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID-19). *China CDC Weekly*. 2020;2(8):123-4. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.033>
26. Zhang J, Wang S, Xue Y. Fecal specimen diagnosis 2019 novel coronavirus-infected pneumonia. *J Med Virol*. 2020;92(6):680-2. <https://doi.org/10.1002/jmv.25742>
27. Wigginton KR, Boehm AB. Environmental engineers and scientists have important roles to play in stemming outbreaks and pandemics caused by enveloped viruses. *Environ Sci Technol*. 2020;54(7):3736-9. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01476>
28. La Rosa G, Mancini P, Bonanno FG, et al. SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: evidence from environmental monitoring. *Sci Total Environ*. 2020;750:141711. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141711>
29. Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardosa MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol*. 2010;9(11):1097-105. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70209-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X)
30. Gerba CP. Virus occurrence and survival in the environmental waters. *Perspect Med Virol*. 2007;17:91-108.

- [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17005-1](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17005-1)
31. Hemalatha M, Kiran U, Kuncha SK, et al. Surveillance of SARS-CoV-2 spread using wastewater-based epidemiology: Comprehensive study. *Sci Total Environ.* 2021;768:144704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144704>
  32. Gerba CP. Environmentally transmitted pathogens. *Environmental Microbiology.* 2009:445-84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00022-3>
  33. Bibby K, Aquino de Carvalho N, Wigginton K. Research needs for wastewater handling in virus outbreak response. *Environ Sci Technol.* 2017;51(5):2534-5. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06492>
  34. Rusiñol M, Gironés R. Summary of excreted and waterborne viruses. In: Rose JB, Jiménez-Cisneros B (Eds) *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO, 2017. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.19>
  35. Wu Y, Guo C, Tang L, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral ssRNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(5):434-35. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)
  36. Sun J, Zhu A, Li H, et al. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9:991-3. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1760144>
  37. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
  38. Chen Y, Chen L, Deng Q, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2020;92(7):833-40. <https://doi.org/10.1002/jmv.25825>
  39. Lo IL, Lio CF, Cheong HH, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. *Int J Biol Sci.* 2020;16:1698-707. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45357>
  40. Lin L, Jiang X, Zhang Z, et al. Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. *Gut.* 2020;69(6):997-1001. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321013>
  41. Wu F, Xiao A, Zhang J, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems.* 2020;5(4):e00614-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00614-20>
  42. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020;158(6):1831-3.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>
  43. Wang XW, Li JS, Guo TK, et al. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital. *J Virol Methods.* 2005;128(1-2):156-61. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.03.022>
  44. Wurtzer S, Marechal V, Mouchel J, et al. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *medRxiv.* 2020;2020.04.12.20062679. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>
  45. La Rosa G, Bonadonna L, Lucentini L, Kenmoe S, Suffredini E. Coronavirus in water environments: occurrence, persistence and concentration methods-A scoping review. *Water Res.* 2020;179:115899. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899>
  46. Nemudryi A, Nemudraia A, Wiegand T. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *Cell Rep Med.* 2020;1(6):100098. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100098>
  47. Wigginton KR, Ye Y, Ellenberg RM. Emerging investigators series: the source and fate of pandemic viruses in the urban water cycle. *Environ Sci Water Res Technol.* 2015;6(1):735-46. <https://doi.org/10.1039/C5EW00125K>
  48. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock TD. *Brock Biology of Microorganisms.* Pearson Education, 2018.
  49. Xagorarakis I, Yin Z, Svambayev Z. Fate of viruses in water systems. *J Environ Eng.* 2014;140(7):04014020. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000827](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000827)
  50. Greening GE, Hewitt J, Lewis GD. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J Appl Microbiol.* 2002;93:745-50. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01741.x>
  51. Wang XW, Li JS, Jin M, et al. Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Virol Methods.* 2005;126(1-2):171-7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.005>
  52. Ahmed W, Bertsch PM, Bivins A, et al. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci Total Environ.* 2020;739:139960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>
  53. Peccia J, Zulli A, Brackney DE., et al. SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics. *medRxiv.* 2020;2020.05.19.20105999. <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>

54. Gonzalez R, Curtis K, Bivins A, et al. COVID-19 surveillance in southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Res.* 2020;186:116296.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>
55. Green H, Wilder M, Collins M, et al. Quantification of SARS-CoV-2 and cross-assembly phage (crAssphage) from wastewater to monitor coronavirus transmission within communities. *medRxiv.* 2020;2020.05.21.20109181.  
<https://doi.org/10.1101/2020.05.21.20109181>
56. Sherchan SP, Shahin S, Ward LM, et al. First detection of SARS-CoV-2 ssRNA in wastewater in North America: a study in Louisiana, USA. *Sci Total Environ.* 2020;743:140621
57. Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, et al. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany-suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ.* 2020;751:141750.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>
58. Fongaro G, Stoco PH, Sobral Marques Souza D, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci Total Environ.* 2020;778:146198.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146198>
59. Prado T, Fumian, TM, Mannarino CF, Maranhão AG, Siqueira MM, Miagostovich MP. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality. Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115:e200196.  
<https://doi.org/10.1590/0074-02760200196>
60. Mlejnkova H, Sovova K, Vasickova P, Ocenaskova V, Jasikova L, Juranova E. Preliminary study of Sars-Cov-2 occurrence in wastewater in the Czech Republic. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(15):5508.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph17155508>
61. Guerrero-Latorre L, Ballesteros I, Villacrés-Granda I, et al. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. *Sci Total Environ.* 2020;743:140832.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140832>
62. Trottier J, Darques R, Ait Mouheb N, et al. Post-lockdown detection of SARS-CoV-2 RNA in the wastewater of Montpellier, France. *One Health.* 2020;10:100157.  
<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100157>
63. Kumar M, Patel AK, Shah AV. First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARSCoV-2. *Sci Total Environ.* 2020;746:141326.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141326>
64. Arora S, Nag A, Sethi J, Rajvanshi J, et al. Sewage surveillance for the presence of SARS-CoV-2 genome as a useful wastewater based epidemiology (WBE) tracking tool in India. *Water Sci Technol.* 2020;82(12):2823-36.  
<https://doi.org/10.2166/wst.2020.540>
65. Martin J, Klapsa D, Wilton T. Tracking SARS-CoV-2 in sewage: evidence of changes in virus variant predominance during COVID-19 pandemic. *Viruses.* 2020;12(10):E1144.  
<https://doi.org/10.3390/v12101144>
66. Bar-Or I, Yaniv K, Shagan M, et al. Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance. *medRxiv.* 2020;2020.04.26.20073569.  
<https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20073569>
67. Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simón P, Allende A, Sánchez G. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 2020;181:115942.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
68. Balboa S, Mauricio-Iglesias M, Rodríguez S, et al. The fate of SARS-COV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for detection of COVID-19. *Sci Total Environ.* 2021;772:145268.  
<https://doi.org/10.1101/2020.05.25.20112706>
69. Chavarria-Miró G, Anfruns-Estrada E, Guix S, Paraira M. Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases. *medRxiv.* 2020;2020.06.13.20129627.  
<https://doi.org/10.1101/2020.06.13.20129627>
70. Rimoldi SG, Stefani F, Gigantiello A, et al. Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Sci Total Environ.* 2020;744:140911.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>
71. Yaqub T, Nawaz M, Shabbir MZ, et al. A longitudinal survey for genome-based identification of SARS-CoV-2 in sewage water in selected lockdown areas of Lahore city, Pakistan; a potential approach for future smart lockdown strategy. *medRxiv.* 2020;2020.07.31.20165126.  
<https://doi.org/10.1101/2020.07.31.20165126>
72. Sharif S, Ikram A, Khurshid A, et al. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater, using the existing environmental surveillance network: An epidemiological gateway to an early warning for COVID-19 in communities. *medRxiv.* 2020;2020.06.03.20121426.  
<https://doi.org/10.1101/2020.06.03.20121426>
73. Ampuero M, Valenzuela S, Valiente-Echeverria F, et al. SARS-CoV-2 detection in sewage in Santiago, Chile - preliminary results. *medRxiv.* 2020;2020.07.02.20145177.  
<https://doi.org/10.1101/2020.07.02.20145177>

74. Kocamemi BA, Kurt H, Hacıoglu S, Yarali C, Saatci AM, Pakdemirli B. First data-set on SARS-CoV-2 detection for Istanbul wastewaters in Turkey. medRxiv. 2020;2020.05.03.20089417. <https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089417>
75. Kocamemi BA, Kurt H, Sait A, Sarac F, Saatci AM, Pakdemirli B. SARS-CoV-2 detection in Istanbul wastewater treatment plant sludges. medRxiv. 2020;2020.05.12.20099358 <https://doi.org/10.1101/2020.05.12.20099358>
76. Kocamemi BA, Kurt H, Sait A, et al. Nationwide SARS-CoV-2 Surveillance study for sewage and sludges of wastewater treatment plants in Turkey. medRxiv. 2020;2020.11.29.20240549 <https://doi.org/10.1101/2020.11.29.20240549>
77. Araud E, Fuzawa M, Shisler JL, Li J, Nguyen TH. UV inactivation of rotavirus and Tulane virus targets different components of the virions. Appl Environ Microbiol. 2020;86(4):e02436-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02436-19>
78. Callanan J, Stockdale SR, Shkoporov A, Draper LA, Ross RP, Hill C. Expansion of known ssRNA phage genomes: from tens to over a thousand. Sci Adv. 2020;6(6):eaay5981. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay5981>
79. Ye Y, Ellenberg RM, Graham KE, Wigginton KR. Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. Environ Sci Technol. 2016;50:5077-85. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>
80. Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. Science Forum: SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. eLife. 2020;9:e57309. <https://doi.org/10.7554/eLife.57309>
81. Watanabe T, Bartrand TA, Weir MH, Omura T, Haas CN. Development of a dose-response model for SARS coronavirus. Risk Anal. 2010;30:1129-38. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2010.01427.x>
82. Lindsley WG, Pearce TA, Hudnallet JB, et al. Quantity and size distribution of cough-generated aerosol particles produced by influenza patients during and after illness. J Occup Environ Hyg. 2012;9(7):443-9. <https://doi.org/10.1080/15459624.2012.684582>
83. Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. Lancet Microbe. 2020;1(4):e145. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30003-3)
84. Geller C, Varbanov M, Duval RE. Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies. Viruses. 2012;4(11):3044-68. <https://doi.org/10.3390/v4113044>
85. Gundy PM, Gerba CP, Pepper IL. Survival of coronaviruses in water and wastewater. Food Env. Virol. 2009;1:10. <https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>
86. Adapted from "Quantifying SARS-Cov-2 virions in city wastewater", by BioRender (2021). [<https://app.biorender.com/biorender-templates>] (Erişim tarihi: 28.07.2021)
87. Castiglioni S, Thomas KV, Kasprzyk-Hordern B, Vandam L, Griffiths P. Testing wastewater to detect illicit drugs: state of the art, potential and research needs. Sci Total Environ. 2014;487:613-20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.034>
88. Hart OE, Halden RU. Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: feasibility, economy, opportunities and challenges. Sci Total Environ. 2020;730:138875. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138875>
89. Brisebois E, Veillette M, Dion-Dupont V, et al. Human viral pathogens are pervasive in wastewater treatment center aerosols. J Environ Sci (China). 2018;67:45-53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.07.015>
90. Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, et al. Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. Appl Environ Microbiol. 2004;70:5434-40. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5434-5440.2004>
91. Cashdollar JL, Wymer L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. J Appl Microbiol. 2013;115(1):1-11. <https://doi.org/10.1111/jam.12143>
92. Haramoto E, Kitajima M, Hata A, et al. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. Water Res. 2018;135:168-86. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>
93. Petrovich ML, Ben Maamar S, Hartmann EM, Murphy BT, Poretsk RS, Wells GF. Viral composition and context in metagenomes from biofilm and suspended growth municipal wastewater treatment plants. Microb Biotechnol. 2019;12(6):1324-36. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13464>
94. Ye Y, Chang PH, Hartert J, Wigginton KR. Reactivity of enveloped virus genome, proteins, and lipids with free chlorine and UV 254. Environ Sci Technol. 2018;52(14):7698-708. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00824>
95. Kitajima M, Iker BC, Pepper IL, Gerba CP. Relative abundance and treatment reductin of viruses during wastewater treatment processes - identification of potential viral indicators. Sci Total Environ. 2014;488:290-6.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.087>
96. Zhou J, Wang XC, Ji Z, Xu L, Yu Z. Source identification of bacterial and viral pathogens and their survival/fading in the process of wastewater treatment, reclamation and environmental reuse. *World J Microb Biotechnol.* 2015;31(1):109-20.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1770-5>
97. Shirasaki N, Matsushita T, Matsui Y, Oshiba A, Ohno K. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation - rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. *Water Res.* 2010;44(5):1307-16.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.038>
98. Chaudhry RM, Nelson KL, Drewes JE. Mechanisms of pathogenic virus removal in a full-scale membrane bioreactor. *Environ Sci Technol.* 2015;49(5):2815-22.  
<https://doi.org/10.1021/es505332n>
99. Lv W, Zheng X, Yang M, Zhang Y, Liu Y, Liu, J. Virus removal performance and mechanism of a submerged membrane bioreactor. *Process Biochem.* 2006;41(2):299-304.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.005>
100. Zhang M, Xu LM, Xu PC, Wang XC. Elimination of viruses from domestic wastewater: requirements and technologies. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016;32(4):69-78.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2018-3>
101. Jofre GJ, Montemayor M, Lucena F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2420-9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x>
102. Dumontet S, Dinel H, Baloda SB. Pathogen reduction in sewage sludge by composting and other biological treatments: a review. *Biol Agric Hort.* 1999;16(4):409-30.  
<https://doi.org/10.1080/01448765.1999.9755243>
103. Carducci A, Battistini R, Rovini E, Verani M. Viral removal by wastewater treatment: Monitoring of indicators and pathogens. *Food Environ Virol.* 2009;1:85-91.  
<https://doi.org/10.1007/s12560-009-9013-x>
104. Qiu Y, Lee BE, Neumann N, et al. Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada. *J Appl Microbiol.* 2015;119(6):1729-39.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12971>
105. Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD. *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse.* McGraw-Hill; 2004.
106. Wigginton KR, Pecson BM, Sigstam T, Bosshard F, Kohn T. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ Sci Technol.* 2012;46(21):12069-78.  
<https://doi.org/10.1021/es3029473>
107. Ison A, Odeh IN, Margerum DW. Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione. *Inorg Chem.* 2006;45(21):8768-75.  
<https://doi.org/10.1021/ic0609554>
108. Torrey J, Gunten U, Kohn T. Differences in viral disinfection mechanisms as revealed by quantitative transfection of echovirus 11 genomes. *Appl Environ Microb.* 2019;85(14): e00961-1019.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00961-19>
109. Duan SM, Zhao XS, Wen RF, et al. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomed Environ Sci.* 2003;16(3):246-55.
110. Derraik JGB, Anderson WA, Connelly EA, Anderson YC. Rapid evidence summary on SARS-CoV-2 survivorship and disinfection, and a reusable PPE protocol using a double-hit process. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(17):6117.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph17176117>
111. von Sonntag C, von Gunten U. *Chemistry of Ozone in Water and Wastewater Treatment: From Basic Principles to Applications.* IWA Publishing;2012.
112. von Sonntag C. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair A Chemical Perspective.* Almanya, Springer;2006.
113. Meşe S, Ağaçfidan A. Coronavirus: Genel özellikler ve güncel yaklaşım. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi.* 2020;3(S1):14-23.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-S1-0002>
114. Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S. SARS-CoV-2 Transmission from people without COVID-19 symptoms. *JAMA Netw Open.* 2021;4(1):e2035057.  
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35057>
115. Benefield AE, Skrip LA, Clement A, Althouse RA, Chang S, Althouse BM. SARS-CoV-2 viral load peaks prior to symptom onset: a systematic review and individual-pooled analysis of coronavirus viral load from 66 studies. *medRxiv.* 2020;2020.09.28.20202028.  
<https://doi.org/10.1101/2020.09.28.20202028>
116. Gallardo-Escárate C, Valenzuela-Muñoz V, Núñez-Acuña G, et al. The wastewater microbiome: A novel insight for COVID-19 surveillance. *Sci Total Environ.* 2021;10;764:142867.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142867>
117. Crits-Christoph A, Kantor RS, Olm MR, et al. Genome sequencing of sewage detects regionally prevalent SARS-CoV-2 variants. *Mbio.* 2021;12(1):e02703-20.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.02703-20>
118. Barceló D. Wastewater-Based Epidemiology to monitor COVID-19 outbreak: Present and future diagnostic methods to be in your radar. *Case Stud Chem Environ Eng.* 2020;2:100042.  
<https://doi.org/10.1016/j.cscee.2020.100042>



# Candida Vajiniti Tedavisinde Umut: İbreksafungerp

## Hope in the Treatment of Candida Vaginitis: Ibrexafungerp

Ayşe Sultan Karakoyun<sup>®</sup>, Macit İlkit<sup>®</sup>

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Adana, Türkiye

Atf/Cite as: Karakoyun AS, İlkit M. Candida vajiniti tedavisinde umut: İbreksafungerp, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):326-33.

### Öz

*Candida vajiniti (CV) ihmal edilen, ancak her geçen gün daha da büyüyen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Her dört kadından üçünün en az bir kez CV atağı geçirdiği düşünülmektedir. Kadınların vajina veya vulva yakınmaları olduğunda kendi kendine tanı koyma ve reçetesiz ilaç kullanma eğilimi ve klinisyenlerin yalnızca klinik bulgulara göre tedavi planlaması nedeni ile CV'nin tanısı ve tedavisi çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Günümüzde CV tedavisi için öncelikli tercih edilen oral azollerin güvenlik ve etkinliklerine ilişkin sınırlamalar söz konusu olup bu ilaçların klinik veya mikolojik iyileşmeye etkileri istenilen düzeye ulaşamamıştır. Ayrıca, tedavide kullanılan var olan ilaçlara ilişkin seçenekler çok çeşitli değildir ve bu sebeple acil olarak yeni antifungal ilaçların geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır. Enfumafungin kökenli yarı-sentetik triterpenoid glukana sentaz inhibitörü olan İbreksafungerp (IBX), akut CV'nin tedavisinde umut verici oral antifungal olarak gösterilmiş ve kullanımı 1 Haziran 2021'de onaylanmıştır. IBX, oral biyoyararlanımının yüksek olması, düşük yan etki riski, ilaç-ilaç etkileşiminin az olması, iyi doku penetrasyonu, vajinada düşük pH değerlerinde aktivite artışı ve çoklu ilaca dirençli mantarlara etkisi ile dikkat çekmektedir. Sunulan bu derlemede, IBX'e ilişkin in vitro ve in vivo veriler güncel bilgiler ışığında değerlendirildi ve sunuldu.*

**Anahtar kelimeler:** Antifungal ilaçlar, aspergilloz, fungerp, kandidoz, mantar hücre duvarı

### ABSTRACT

*Candida vaginitis (CV) is a neglected but growing public health problem. It is estimated that three out of four women have had at least one CV attack. The diagnosis and treatment of CV is often inadequate due to the tendency of women to self-diagnose and use over-the-counter drugs when they have vaginal or vulvar complaints, and clinicians plan treatment only according to clinical findings. There are limitations regarding the safety and efficacy of oral azoles, which are primarily preferred for the treatment of vaginitis, and these drugs have not revealed the desired levels of clinical or mycological cure. Also, there are a few options for current drugs used for treatment are not numerous the development of new antifungal drugs is thus urgently needed. Ibrexafungerp (IBX) is a semisynthetic triterpenoid glucan synthase inhibitor derived from enfumafungin. IBX has been shown to be a promising oral antifungal in the treatment of acute CV, and its use was approved on June 1, 2021. IBX is remarkable by its high oral bioavailability, low risk of side effects, few drug-drug interactions, good tissue penetration, increased activity at low pH in the vagina, and efficacy with regard to multi-drug-resistant fungi. In this review, in vitro and in vivo data on IBX were evaluated and compiled in light of current knowledge.*

**Keywords:** Antifungal agents, aspergilloz, candidiasis, fungal cell wall, fungerp

**Alındığı tarih / Received:**  
28.06.2021 / 28.June.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
05.08.2021 / 05.August.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

A.S. Karakoyun 0000-0002-2717-6343  
M. İlkit 0000-0002-1174-4182

✉ macitilkit@gmail.com

### GİRİŞ

*Candida vajiniti (CV) her 10 kadından en az yedisini yaşamın herhangi bir döneminde etkileyen ve kadınlarda en sık görülen mantar hastalıklarındandır. Kadınların %70-75'inin yaşamları boyunca en az bir*

*kez CV atağı geçirdiği, %40-45'inin ise iki veya daha çok CV atağına maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Son 12 ay içerisinde  $\geq 4$  atak geçirilmesi ise rekürren CV (RCV) olarak tanınır ve hastaların %5-9'unda görülür<sup>(1-3)</sup>. Bu durum iyi bilinmesine karşılık, klinik veya mikolojik tanı genellikle önemsenmez; tam ve*

doğru tanı atlanarak CV'nin kolay tedavi edilebilen bir hastalık olduğu kabul edilir. Bildirimi zorunlu bir hastalık olmadığından CV'nin gerçek prevalansı ve etkenleri halen tam anlamı ile bilinmemekte ve rastgele ilaç seçimi ile klinik tablo daha karmaşık bir durum almaktadır<sup>(4-6)</sup>. Oysa bu durumun çözümü çok uzak ve zorlu değildir. Tüm dünyada doğru tedavinin ilk adımı olarak doğru tanının gerekliliği vurgulanmalı ve mikrobiyoloji laboratuvarları vajina yakınmaları olan her hastayı rutin olarak incelemeleri (mikroskop ve kültür) için özendirilmelidir<sup>(7)</sup>. Üstelik bu yöntemler az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde dahi kolayca uygulanabilir, altyapı gerektirmez ve ucuzdur<sup>(8)</sup>.

Bir çalışmada, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran ve gebe olmayan 284 kadında CV'nin insidansı, semptomları, tedavisi ve izlem sonuçları internet aracılığı ile sorgulanmış ve katılımcıların %78'inin CV'ne, %34'ünün ise RCV'ne maruz kaldıkları rapor edilmiştir. Her iki grupta öne çıkan yakınma ve bulgular kaşıntı, yanma ve kızarıklıktır. Risk faktörleri arasında ise antibiyotik kullanımı en baskın parametre olarak dikkat çekmiş, ayrıca cinsel ilişki, nemli iklim ve kadın hijyen ürünlerinin kullanımı da bu faktörler arasında yer almıştır. Ancak, her iki grupta yer alan büyük çoğunluk CV ataklarının "idiyopatik" olduğunu belirtmişlerdir. Jinekolog tarafından tedavi edilen grupta %87 iyileşme sağlanmış, kendi kendini tedavi eden grupta ise bu oran %57 olarak bildirilmiştir<sup>(9)</sup>. Yano ve arkadaşlarının<sup>(9)</sup> bu verileri CV tedavisinin planlanmasında çok önemlidir. Şöyle ki; (i) hekim desteği, (ii) salt ilaç yazmak yerine iyi ve yeterli bir anamnez ile kan ve hormon profillerinin belirlenmesi ve (iii) risk faktörlerinin eliminasyonu veya kontrolü hastalığın ve özellikle RCV'nin iyileşmesine katkı sağlayacaktır. Bu modern ve güncel yaklaşım ile hastaların yaşam kalitesi artırılmalıdır<sup>(5,10)</sup>. Ayrıca, RCV olgularının büyük bir kısmı semptomların baskılanması için uzun süreli veya devamlı destek tedavisine gereksinim duyar. Özellikle RCV'nde tedaviye yanıtızsızlık önemli bir sorundur ve tedavi 6-12 ay sürmesine karşılık, başarı oranları sınırlıdır<sup>(3-6)</sup>.

RCV, kadınların yaşam kalitesini fiziksel, psikolojik ve sosyal yönden etkileyen bir hastalıktır<sup>(11)</sup>. Cinsel akti-

vitede azalma, ev ve iş memnuniyetsizliği, huzursuzluk, ekonomik üretkenlikte azalma, sosyal ilişkilerin bozulması ve bazen psikolojik travmalar eşlik edebilir<sup>(7,11)</sup>. RCV nedenleri veya eşlik eden parametreler başka makalelerde ayrıntılı olarak incelenmiş olup, bu makalede değinilmeyecektir<sup>(1-4,6)</sup>. Ancak her yıl 138 milyon kadının RCV'ne maruz kaldığı ve bu sayının 2030 yılı itibarı ile 158 milyona ulaşacağı hesaplanmıştır. Bu durum gerek jinekologları gerekse mikologları endişelendirmektedir<sup>(1)</sup>. Örnek olarak, ülkemizde her yıl 100.000 kadından 3.342'sinin RCV ataklarına maruz kaldığı öngörülmektedir<sup>(12)</sup>. RCV, gelişmiş ülkelerde 14.39 milyar doları bulan önemli bir ekonomik yüke neden olmaktadır<sup>(1)</sup>. Maalesef bu durum klinik olarak önemsenmez, bilimsel araştırmaların hedef konusu olmaz ve bütçe planlaması yapılmaz. Ayrıca hem hekimler hem de hastalar için yönetimi zor ve yorucu bir süreci beraberinde getirir. Bu nedenle CV ile ilgili tüm paydaşlar bilgilendirilmeli, hizmet içi eğitime önem ve öncelik verilmeli, konunun önemi vurgulanmalı, tanı ve tedaviye ilişkin algoritmalar geliştirilmelidir. Bu sorunun klinisyen-laboratuvar iş birliği ile aydınlatılabileceği ve çözülebileceği açıktır.

Yirmi birinci yüzyılda karşılaştığımız bir başka sorun da hem invaziv hem de yüzeysel mikoz etkeni azol dirençli *Candida* türlerinin tedavisinde önemli zorlukların yaşanmasıdır. Mantar, konak ve ilaç-ilişkili bir dizi faktör ilaç direncine katkı sunmakta ve antifungal tedavinin başarı şansını yine bu üçlü belirlemektedir<sup>(13)</sup>. Üstelik *Candida* ve konak ilişkisinde hâlen bilinmeyen birçok nokta söz konusudur<sup>(14)</sup>. Günümüzde, rastgele ilaç yazılması veya gereksiz ilaç kullanımı sonucu oluşan flukonazol (FLU)'e dirençli *Candida albicans* ve *albicans*-dışı CV'lerinde şaşırtıcı derecede artış yaşandığı bilinmektedir<sup>(15)</sup>. Bu durum tedavide güçlü alternatifleri zorunlu kılmaktadır<sup>(16)</sup>.

Bu derlemede, ülkemiz için bir halk sağlığı sorunu olan CV'nde tanı ve tedaviye ilişkin ana başlıklar ve sorunların meslektaşlarımızla paylaşılması ve konunun öneminin yine vurgulanması amaçlandı. Ayrıca, CV'nin tedavisinde yeni bir umut ve yeni bir antifungal ilaç olan oral ibrenksafungerp (IBX)'e ilişkin *in vivo* ve *in vitro* güncel bilgiler değerlendirildi.

## Etkenler

CV olgularının %80-90'ında *Candida albicans* etken iken son yıllarda *albicans*-dışı *Candida* türlerinin prevalansında artış olduğu ve görülme oranlarının %10-45'e ulaştığı bilinmektedir<sup>(3,14)</sup>. Kısaca bu türler; *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ve *Candida dubliniensis*'dir<sup>(2,3,17)</sup>. Bu *Candida* türlerinin artışına gerekçe olarak; (i) azol grubu antifungal vajinal ilaçların aşırı ve bilinçsiz kullanımı, (ii) tek doz tedavi ve (iii) düşük doz azol koruma tedavisi gösterilmiştir. Özellikle, rastgele topikal klotrimazol veya oral FLU kullanımının FLU-yanıtsız veya dirençli *Candida* kökenlerinin ortaya çıkmasına neden olduğu ve sonuç olarak FLU tedavisinin başarısızlık ile sonlandığı bildirilmiştir<sup>(15)</sup>.

Genel olarak *C. albicans* vajinitinde FLU direncinin ender olduğu düşünülse de gerçekte ilaç direncinin giderek artan, önemli bir sorun olduğu açıktır. Bu durum bilim çevrelerince en az 10 yıldır bilinmektedir<sup>(18)</sup>. Tek doz FLU uygulaması ile vajina sekresyonlarında ilaç konsantrasyonunun yeterli düzeye ulaşılabilirdiği ve %69 klinik iyileşme elde edildiği rapor edilmiştir<sup>(19)</sup>. *Candida glabrata* ise intrinsik olarak FLU de dâhil olmak üzere birçok azole dirençlidir. Bu nedenle, FLU-dirençli *C. albicans* ve *C. glabrata*'yı vajinadan eradike etmek güçtür<sup>(4,16)</sup>.

## Güncel tedavi yöntemleri

Sporadik akut CV için herhangi bir topikal veya oral antifungal kullanılabilir. Buna karşılık RCV'nde bu yaklaşım yeterli değildir. RCV, kronik bir hastalık gibi yönetilmeli, uzun süreli, profilaktik ve süpresif tedavi planlanmalıdır<sup>(5)</sup>. CV'nin akut ve rekürren şekillerine özgü ilaç kullanımına ilişkin ayrıntılı ve güncel eser henüz yayınlanmıştır<sup>(3)</sup>. Ayrıca RCV'nin tedavisi için FDA tarafından önerilen bir ilaç henüz yoktur<sup>(7)</sup>. RCV'nin tedavisinde hemen daima FLU kullanılmakla birlikte, tam iyileşme (klinik ve mikolojik iyileşme) sınırlıdır<sup>(3,5,16)</sup> ve tedavinin etkisi sürdürülebilir değildir<sup>(7)</sup>. Mevcut seçeneklere ilişkin önemli sorunlar veya sınırlamalar söz konusudur. Şöyle ki; (i) özellikle eşlik eden bir başka hastalığın varlığı, (ii) başka

bir ilaç ile eşzamanlı kullanılmama durumu, (iii) gebelik ve (iv) azol-dirençli izolatların varlığı mevcut ilaçların kullanımını sınırlamaktadır<sup>(20)</sup>. Bir başka çalışmada ise azol dirençli *Candida* türlerinin etken olduğu CV'inin tedavi yöntemleri ayrıntılı olarak irdelenmiş olup, bu çalışmada tartışmaya açılmayacaktır<sup>(16)</sup>.

## Yeni bir umut: İbreksafungerp (önceleri SCY-078 veya MK-3118)

IBX (Brexafemme®), triterpenoid, enfumafungin-kökenli, glukon sentaz inhibitörü olup, 20 yıl aradan sonra geliştirilen yeni sınıf oral ve intravenöz kullanımı olan antifungal ilaçtır (Scynexis A.Ş., Jersey City, NJ, ABD)<sup>(23,24)</sup>. IBX, ekinokandinler gibi mantar hücre duvarının polimeri olan (1→3)-β-D-glukan (BDG) sentezini non-kompetitif inhibe ederek etki gösterir<sup>(7,21,22)</sup>. IBX, yine ekinokandinler gibi yüksek oranda proteinlere bağlanır, dokulara geçişi iyidir, ancak santral sinir sistemine geçişi zayıftır<sup>(25)</sup>.

Hücre duvarı, mantar hücrelerinin homeostazı için gerekli olup, mantar hücresi hacminin yaklaşık %40'ını oluşturur, güçlü ve esnek yapıdadır. Hücre duvarı iki katmanlı bir yapı olup, (i) iç katman kitin ve glukandan oluşur, iskelet yapıyı oluşturur; hücre duvarı kuru ağırlığının %50-60'ını BDG oluşturur, (ii) dış katman ise daha heterojen bir yapıdadır; N-bağlı ve O-bağlı oligosakkaritlerden ibaret mannoz bağlı glikoproteinler içerir ve türe-özümlenir özellikleri ile dikkat çeker<sup>(26)</sup>. BDG, düşük ökaryotlara özgü olup, BDG sentaz enzimini hedef alan ilaçların insanlara toksik etkisi azdır<sup>(22)</sup>. Bu etki mekanizması ile güçlü ve geniş spektrumlu antifungal etki sağlar. İnvaziv *Candida* hastalıklarının tedavisi için glukon sentaz inhibitörleri olan ekinokandinler 2001'de tanıtılmış ve ilk olarak kaspofungin onaylanmış, daha sonra da mikafungin ve anidulafungin kullanıma girmiştir<sup>(21)</sup>. Ekinokandinler, BDG sentaz inhibisyonu ile *Candida* türlerinde hücrenin ölümüne (fungisit etki) neden olur<sup>(27)</sup>, *Aspergillus* türlerinde ise hifin morfogenezini değiştirerek fungostatik etki gösterir<sup>(28)</sup>. Ekinokandin ve IBX'in BDG sentaz enzimi üzerinde bağlandığı noktalar farklıdır; bu sebeple ekinokandinlere karşı çapraz direnç öngörülmemektedir<sup>(21,22)</sup>.

Enfumafungin, hem yapısal hem de etki mekanizması yönü ile ekinokandinlerden farklı, "fungerp" adı verilen yeni bir sınıf antifungaldir (antifungal triterponoid)<sup>(22)</sup>. IBX, oral biyoyararlanımı olan, potensi ve stabilitesi artırılmış enfumafungin derivelerinin sentetik modifikasyonu ile keşfedilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün ilgili komisyonunca bu ilaca IBX adı verilmiştir<sup>(22)</sup>.

IBX, CV tedavisinde oral yoldan kullanılan ve azol olmayan ilk ilaçtır. Önerilen doz ve uygulama şekli 600 mg/gün (günde iki kez, 150 mg'lık ikişer tablet) olup, yemek sırasında veya aç karnına alınabilir. Zorunlu olmadıkça CYP3A inhibitörleri ile kullanılmamalıdır. Eğer birlikte kullanılması gerekiyor ise dozu 300 mg'ı aşmamalıdır. Gebelik sırasında ve hipersensitivite öyküsü olan bireylerde kullanımı önerilmez. Hayvan deneyleri gebelik sırasında fetusa zarar verebileceğini göstermiştir. Bu nedenle, tedaviye başlamadan hemen önce gebelik varlığı araştırılmalı ve üreme çağında bulunan kadınlara IBX kullanımı sırasında etkili kontrasepsiyon önerilmelidir<sup>(29)</sup>.

### Farmakokinetik özellikleri

Ekinokandin sınıfı ilaçların oral biyoyararlanımı yoktur ve yalnızca intravenöz uygulanabilirler. Yeni antifungal ilaç IBX'in en önemli farmakokinetik avantajı ise oral biyoyararlanımıdır<sup>(21,22)</sup>. Sıçanlarda oluşturulan invaziv mantar hastalıklarında, IBX'in oral veya intravenöz uygulamalarında karaciğer, akciğer, dalak, kemik iliği, kas, vajina ve deride plazmadan daha yoğun bulunduğu gösterilmiştir<sup>(24)</sup>. Ağız yolu ile uygulama sonrası köpek, fare ve sıçanlarda gastrointestinal kanalda kısa sürede emildiği görülmüştür. Oral biyoyararlanımının %40, eliminasyon şeklinin ise safra ve dışkı (%90) ve idrar (%1.5) aracılığı ile olduğu ortaya konulmuştur. Yarılanma süresi ortalama 8 saattir. Kantitatif tüm vücut radyografisinde ilacın 8 saat içerisinde dağıldığı ve doz uygulamasından 168 saat sonra elimine edildiği bildirilmiştir<sup>(24)</sup>.

### *Candida* vajiniti-In vitro çalışmalar

Akut CV tedavisinde standart antifungal duyarlılık testleri (ADT) önerilirse de özellikle *albicans*-dışı

*Candida* türlerinin etken olduğu tedaviye dirençli veya RCV'inde ADT uygulanmalıdır. Ancak, önerilen sıvı dilüsyon yöntemleri vajina izolatlarında direnç profilini ortaya koymakta yeterli değildir. Bu sınırlamanın, vajinanın asidik ortamından kaynaklandığı düşünülmektedir<sup>(30)</sup>. Bu nedenle, RCV izolatlarına ilişkin pH 7.0'de yapılan ADT'lerinin doğru sonucu vermeyebileceği düşünülmüştür<sup>(31)</sup>.

Sobel ve ark.<sup>(32)</sup> CLSI yöntemi ile test edilen 52 FLU-dirençli *C. albicans* (FLU MIC >2 mg/ml), 30 FLU-duyarlı *C. albicans* (FLU MIC ≤2 mg/ml), 30 *C. glabrata* ve her birinden 25 adet *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* olmak üzere toplam 187 *Candida* kökeninin tamamını IBX'e duyarlı bulmuşlardır. Yazarlar, normal vajina pH'sı (3.8-4.5) ile uyumu test etmek amacı ile ADT'ini hem pH 7.0'de hem de pH 4.5'te denemiş ve fark bulmamışlardır. IBX test besiyerinin pH'sından, diğer antifungal ilaç sınıflarından farklı olarak etkilenmemiştir. Bu durum, CV'nin tedavisi için umut verici bulunmuş ve güçlü bir güven oluşturmuştur. Başka bir çalışmada ise, IBX MIC<sub>90</sub> değerleri pH 4.5'de, pH 7.0 ve pH 5.7'ye kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur<sup>(30)</sup>. Asidik ortamda IBX'in aktivitesinde artış kaydedilmesi CV'nin tedavisi için kuşkusuz avantajdır<sup>(31)</sup>.

Mesquida ve ark.<sup>(33)</sup> ise CV ( $n=72$ ) ve kandidemi tanılı ( $n=72$ ) olgulardan elde edilen izolatları EUCAST yöntemi ile test etmişler ve en yüksek etkinliği IBX'in gösterdiğini (0.03-0.25 mg/L); FLU vahşi-tip (0.059 mg/L) ve FLU vahşi-olmayan tip (0.063 mg/L) izolatları arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Öte yandan, vajina ve kan örneklerinden soyutlanan izolatlarda FLU direnç oranları ise sırası ile %7 ve %1.4 olarak rapor edilmiştir. FLU vahşi-olmayan tip izolatların vajinada (%23.6) kan izolatlarına (%1.4) göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir ( $p < 0.001$ )<sup>(33)</sup>.

### In vivo çalışmalar

IBX'e ilişkin yürütülen iki farmakokinetik, iki invaziv mantar hastalıkları, bir invaziv aspergilloz, iki kandidemi, dört akut CV ve bir RCV olmak üzere toplam 12 araştırmanın bugünlerde sekizi tamamlanmıştır (<https://clinicaltrials.gov>). Bu araştırmalardan, akut CV ile ilişkili olan dört çalışmanın hepsi tamamlanmıştır.

Akut CV'ne ilişkin ilk iki araştırma NCT02679456 ve DOVE (NCT03253094) başarı ile sonuçlanmıştır. Diğer iki randomize, çift-kör ve plasebo kontrollü çok merkezli Faz 3 (VANISH-303 ve VANISH-306; NCT03734991 ve NCT 03987620) çalışması da tamamlanmış ve elde edilen olumlu veriler doğrultusunda CV'nin tedavisinde IBX'in kullanımı 1 Haziran 2021 tarihinde FDA tarafından onaylanmıştır<sup>(29)</sup>. IBX ile sağlanan hem klinik iyileşme [10. gün (erken dönem) ve 25. günde (geç dönem) belirti ve bulguların tamamen iyileşmesi] hem de mikolojik iyileşme oranları plaseboya göre daha başarılı bulunmuştur. Erken ve geç dönem klinik iyileşme oranları; VANISH 303'de sırası ile %51 ve %60, VANISH 306'da ise sırası ile %63 ve %74 bulunmuştur.

Tek günlük IBX tedavisi ile vajina dokusuna yüksek oranda geçiş ek olarak düşük pH'da azol antifungal- lar ile çapraz direnç görülmezsiz fungusit etki sağ- landığı ve ilacın iyi tolere edildiği rapor edilmiştir (Tablo 1). VANISH 303, VANISH 306 ve DOVE çalış- malarına toplamda 850'den fazla gönüllü katılmış olup en sık görülen yan etkiler diyare veya dışkıda şekil bozukluğu (%16.7), bulantı-kusma (%11.8) ve karın ağrısı (%4.5) olarak bildirilmiştir<sup>(29)</sup>. IBX'in en az 20 yıl süre ile güvenle kullanılması beklenmektedir<sup>(7)</sup>. RCV'ni hedefleyen randomize ve çift kör Faz 3 araştır- masında [CANDLE (NCT04029116)] ise tedavinin planlanmasında FLU, IBX ve plasebo sonuçları karşı- laştırılmakta ve projenin Eylül 2021'de tamamlanma- sı hedeflenmektedir<sup>(7,22)</sup>. Çalışma, ayda 1 kez oral 300 mg/gün IBX (150 mgx2) uygulamasının 6 ay süre ile etkisini araştıracaktır. FLU tedavisine yanıt alınama- yan RCV'de IBX'in ümit verici olduğu düşünülmektedir<sup>(7)</sup>.

## Maya ve küf mantarlarına etki

IBX, ekinokandinlere direnç ile ilişkilendirilen *FKS1* ve *FKS2* nokta mutasyonları içeren *C. glabrata*<sup>(23,34-36)</sup>, *C. auris*<sup>(37)</sup> ve biyofilm oluşturan *Candida* türleri<sup>(38)</sup> dâhil olmak üzere *Candida* türlerine<sup>(35)</sup> ve *Aspergillus* türlerine<sup>(39,40)</sup> etkilidir. Azol ve ekinokandinlere direnç- li *Candida* türlerine, FLU'den daha etkili olduğu bildirilmiştir<sup>(35, 41)</sup>. IBX'e direnç BDG sentaz enziminin kodlanmasından sorumlu olan *FKS* gen bölgelerinin (*FKS1* ve *FKS2*) mutasyonları aracılığı ile yürütülür. Ancak, IBX'in BDG sentaz enziminin yapısında yer alan Fks1p ve Fks2p alt birimlerine bağlanma bölge- sinin ekinokandinlerden farklı olması sebebiyle direnç az görülür<sup>(36)</sup>. Vahşi tip ve ekinokandinlere dirençli *Candida* türlerinde *FKS* mutasyonlarının IBX'in aktivitesini çok az etkilediği rapor edilmiştir<sup>(23)</sup>. Nunnally ve arkadaşları,<sup>(34)</sup> IBX'in, *FKS* mutasyonu olan ekinokandine dirençli *C. glabrata* izolatlarına potent aktivite gösterdiğini, ancak bu durumda vahşi tip izolatlarla kıyasla IBX duyarlılığında 1.6-16 kat azalma olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Glukan sentaz inhibitörleri *Aspergillus*'lar da dahil olmak üzere küf mantarlarına fungostatik etki göste- rirler. IBX'in Mucorales takımı (*Rhizopus*, *Mucor*, vb.), *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* ve *Scopulariopsis* türlerine karşı *in vitro* etkisinin değiş- ken olduğu bildirilmiştir<sup>(42)</sup>. Dermatofit türlerine ise potent etkisi kaydedilmiştir<sup>(43)</sup>.

## Sonuçlar ve gelecekteki beklentiler

Doğru tedavi için öncelikle doğru tanının gerektiği

Tablo 1. İbreksafungerp ve flukonazolün mikolojik ve farmakolojik özelliklerinin karşılaştırılması.

	İbreksafungerp (Fungusit)	Flukonazol (Fungostatik)
Etki		
<i>Candida albicans</i>	Evet	Evet (kazanılmış direç)
<i>albicans</i> -dışı <i>Candida</i>	Evet	Kısmen (intrinsik direnç)
Azol dirençli <i>Candida</i>	Evet	Hayır
Asidik pH'da aktivite artışı	Evet	Hayır
Vajina dokusuna geçiş	Evet	Evet
Güvenlik		
Yan etki	Evet (diyare, bulantı-kusma, kas ağrısı)	Evet (döküntü, hepatotoksite, alopesi)
Tolerans	Evet	Evet
Gebelikte risk	Evet	Evet

konusu tüm paydaşlara sabırla ve önemle vurgulanmalı, vajinada enfeksiyon belirtileri olan kadınlar klinik ve mikolojik olarak değerlendirilmelidir. CV'ne ilişkin tüm dünyada bir ilgi veya farkındalık olmadığı da artık anlaşılmalıdır. Bu sorunun aşılabilmesi için ulusal sağlık otoriteleri, yazılı ve görsel basın ve sosyal medya aracılığı ile bilgilendirmeler yapmalı, sürecin parçası olan birimlere tam destek sağlamalıdır. Tedaviye dirençli CV olgularında tanı yeniden gözden geçirilmeli ve gerekli görüldüğünde hasta deneyimli bir dış merkeze yönlendirilmelidir.

Güncel bilgiler, IBX'in diğer mevcut ilaçlara kıyasla vahşi-tip izolatlarla ve diğer antifungal ilaçlara dirençli mantarlara karşı daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu avantaj, daha önce elde edilen deneyimler ile birleştirilmeli ve akılcı ilaç kullanımı ile desteklenmelidir. IBX'e ilişkin veriler artıkça daha geniş perspektif ile ilacı değerlendirme, kullanma ve endikasyon belirleme şansımız olacaktır. Bu özellikler ve ilk veriler, oral tedavi gereksinimi olan veya uzun süreli idame tedavisi alan RCV'li hastalar için umut vericidir.

**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. Denning DW, Kneale M, Sobel JD, Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(11):339-47. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30103-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30103-8)
2. İlkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37(3):250-61. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.576332>
3. Farr A, Effendy I, Frey-Tirri B, et al. Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*. 2021;64(6):583-602. <https://doi.org/10.1111/myc.13248>
4. Sobel JD. Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Drugs*. 2003;63(11):1059-66. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363110-00002>
5. Donders GGG, Bellen G, Mendling W. Management of recurrent vulvo-vaginal candidosis as a chronic illness. *Gynecol Obstet Invest*. 2010;70(4):306-21. <https://doi.org/10.1159/000314022>
6. Donders GGG, Sobel JD. *Candida* vulvovaginitis: A store with a butterfly and a show window. *Mycoses*. 2017;60(2):70-2. <https://doi.org/10.1111/myc.12572>
7. Azie N, Angulo D, Dehn B, Sobel JD. Oral ibrexafungerp: an investigational agent for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2020;29(9):893-900. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1791820>
8. Arastehfar A, Wickes BL, İlkit M, et al. Identification of mycoses in developing countries. *J Fungi*. 2019;5(4):90. <https://doi.org/10.3390/jof5040090>
9. Yano J, Sobel JD, Nyirjesy P, et al. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. *BMC Womens Health*. 2019;19(1):48. <https://doi.org/10.1186/s12905-019-0748-8>
10. Guzel AB, İlkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of ChromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Med Mycol*. 2011;49(1):16-25. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.497972>
11. Fukazawa EI, Witkin SS, Robial R, Vinagre JG, Baracat EC, Linhares IM. Influence of recurrent vulvovaginal candidiasis on quality of life issues. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;300(3):647-50. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05228-3>
12. Hilmioğlu-Polat P, Seyedmousavi S, İlkit M, et al. Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses*. 2019;62(1):22-31. <https://doi.org/10.1111/myc.12842>
13. Arastehfar A, Lass-Flörl C, Garcia-Rubio R, et al. The quiet and underappreciated rise of drug-resistant invasive fungal pathogens. *J Fungi*. 2020;6(3):138. <https://doi.org/10.3390/jof6030138>
14. Makanjuola O, Bongomin F, Fayemiwo SA. An update on the roles of non-*albicans* *Candida* species in vulvovaginitis. *J Fungi*. 2018;4(4):121. <https://doi.org/10.3390/jof4040121>
15. Arastehfar A, Kargar ML, Mohammadi SR, et al. A high rate of recurrent vulvovaginal candidiasis and therapeutic failure of azole derivatives among Iranian women. *Front Microbiol*. 2021; 12:655069. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655069>
16. Sobel JD, Sobel R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant

- Candida* species. Expert Opin Pharmacother. 2018;19(9):971-7.  
<https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1476490>
17. Mintz JD, Martens MG. Prevalence of non-albicans *Candida* infections in women with recurrent vulvovaginal symptomatology. Adv Infect Dis. 2013; 3:238-42.  
<https://doi.org/10.4236/aid.2013.34035>
  18. Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. Obstet Gynecol. 2012;120(6):1407-14.  
<https://doi.org/10.1097/aog.0b013e31827307b2>
  19. Pfizer, Inc. Diflucan package insert. Pfizer, Inc. New York, NY. 2011.
  20. De Punzio C, Garutti P, Mollica G, Nappi C, Piccoli R, Genazzani AR. Fluconazole 150 mg single dose versus itraconazole 200 mg per day for 3 days in the treatment of acute vaginal candidiasis: a double-blind randomized study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003;106(2):193-7.  
[https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(02\)00233-6](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(02)00233-6)
  21. Ghannoum M, Arendrup MC, Chaturvedi VP, et al. Ibrexafungerp: A novel oral triterpenoid antifungal in development for the treatment of *Candida auris* infections. Antibiotics. 2020;9(9):539.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9090539>
  22. Jallow S, Govender NP. Ibrexafungerp: A first-in-class oral triterpenoid glucan synthase inhibitor. J Fungi. 2021;7(3):163.  
<https://doi.org/10.3390/jof7030163>
  23. Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Borroto-Esoda K, Castanheira M. Differential activity of the oral glucan synthase inhibitor SCY-078 against st wild-type and echinocandin-resistant strains of *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(8):00161-17.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00161-17>
  24. Wring S, Borroto-Esoda K, Solon E, Angulo D. SCY-078, a novel fungicidal agent, demonstrates distribution to tissues associated with fungal infections during mass balance studies with intravenous and oral [14C] SCY-078 in albino and pigmented rats. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(2):02119-18.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02119-18>
  25. Davis MR, Donnelley MA, Thompson GR. Ibrexafungerp: A novel oral glucan synthase inhibitor. Med Mycol. 2020;58(5):579-92.  
<https://doi.org/10.1093/mmy/myz083>
  26. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. Microbiol Spectr. 2017;5(3).  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
  27. Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, et al. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(9):3001-12.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.3001-3012.2002>
  28. Aguilar-Zapata D, Petraitiene R, Petraitis V. Echinocandins: The expanding antifungal armamentarium. Clin Infect Dis. 2015;61(6):604-11.  
<https://doi.org/10.1093/cid/civ814>
  29. [https://www.scynexis.com/news-media/press-releases/detail/240/scynexis-announces-fda-approval-of-brexafemme] (Erişim tarihi: 3 Haziran 2020)
  30. Larkin EL, Long L, Isham N, et al. A novel 1,3-Beta-d-Glucan inhibitor, Ibrexafungerp (Formerly SCY-078), shows potent activity in the lower pH environment of vulvovaginitis. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(5): e02611-18.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02611-18>
  31. Danby CS, Boikov D, Rautemaa-Richardson R, Sobel JD. Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(3):1403-6.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.05025-11>
  32. Sobel JD, Borroto-Esoda K, Azie N, Angulo D. In vitro pH activity of ibrexafungerp against fluconazole-susceptible and-resistant *Candida* isolates from women with vulvovaginal candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(8): e0056221.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00562-21>
  33. Mesquida A, Vicente T, Reigadas E, et al. In vitro activity of ibrexafungerp and comparators against *Candida albicans* genotypes from vaginal samples and blood cultures. Clin Microbiol Infect. 2021;27(6):915.e5-915.e8.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.006>
  34. Nunnally NS, Etienne KA, Angulo D, Lockhart SR, Berkow EL. In vitro activity of ibrexafungerp, a novel glucan synthase inhibitor against *Candida glabrata* isolates with FKS mutations. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(11):e01692-19.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01692-19>
  35. Scorneaux B, Angulo D, Borroto-Esoda K, Ghannoum M, Peel M, Wring S. SCY-078 is fungicidal against *Candida* species in time-kill studies. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(3):e01961-16.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01961-16>
  36. Jiménez-Ortigosa C, Perez WB, Angulo D, Borroto-Esoda K, Perlin DS. De novo acquisition of resistance to SCY-078 in *Candida glabrata* involves FKS mutations that both overlap and are distinct from those conferring echinocandin resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(9):e00833-17.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00833-17>
  37. Zhu YC, Barat SA, Borroto-Esoda K, Angulo D, Chaturvedi

- S, Chaturvedi V. Pan-resistant *Candida auris* isolates from the outbreak in New York are susceptible to ibrexafungerp (a glucan synthase inhibitor). *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(4):105922. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105922>
38. Marcos-Zambrano LJ, Gómez-Perosanz M, Escribano P, Bouza E, Guinea J. The novel oral glucan synthase inhibitor SCY-078 shows in vitro activity against sessile and planktonic *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(7):1969-76. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx010>
39. Rivero-Menendez O, Soto-Debran JC, Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A. In vitro activity of ibrexafungerp against a collection of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species and Cyp51A mutants, using EUCAST and CLSI methodologies. *J Fungi*. 2021;7(3):232. <https://doi.org/10.3390/jof7030232>
40. Petraitis V, Petraitiene R, Katragkou A, et al. Combination therapy with ibrexafungerp (formerly SCY-078), a first-in-class triterpenoid inhibitor of (1→3)-β-D-glucan synthesis, and isavuconazole for treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(6):e02429-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02429-19>
41. Schell WA, Jones AM, Borroto-Esoda K, Alexander BD. Antifungal activity of SCY-078 and standard antifungal agents against 178 clinical isolates of resistant and susceptible *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11):e01102-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01102-17>
42. Lamoth F, Alexander BD. Antifungal activities of SCY-078 (MK-3118) and standard antifungal agents against clinical non-*Aspergillus* mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):4308-11. <https://doi.org/10.1128/AAC.00234-15>
43. Ghannoum M, Long L, Sherif R, et al. Determination of antifungal activity of SCY-078, a novel glucan synthase inhibitor, against a broad panel of rare pathogenic fungi. *ASM Microbe 2020, 18-22 Haziran 2020, Chicago, Illinois, ABD*. 2020: AAR03.



# Sınırlı Antibiyotik Seçeneği Olan *Stenotrophomonas maltophilia* Enfeksiyonlarında Antibiyotik Direnç Profili

## Antibiotic Resistance Profile of *Stenotrophomonas maltophilia* Infections with Limited Antibiotic Options

Gökçe Kader Arslan<sup>®</sup>, Fatma Esenkaya Taşbent<sup>®</sup>, Metin Doğan<sup>®</sup>

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

**Atf/Cite as:** Arslan GK, Esenkaya Taşbent F, Doğan M. Sınırlı antibiyotik seçeneği olan *stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonlarında antibiyotik direnç profili, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):334-40.

### Öz

**Amaç:** *Stenotrophomonas maltophilia* son yıllarda sıklıkla hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir. Genel olarak solunum yolu örneklerinden, kandan, idrardan ve drenaj materyallerinden izole edilmektedir. Çoğul antibiyotik direnci nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisinde kısıtlı sayıda antibiyotik kullanılmaktadır. Bu çalışmada, izole edilen *S. maltophilia* suşlarındaki antibiyotik direnç durumunun ve risk faktörlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmada, Ocak 2018-Haziran 2020 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. maltophilia* suşlarının dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Suşların identifikasyon ve antibiyotik duyarlılığı, konvansiyonel yöntemler ve VITEK2 otomatize sistemi ile çalışılmıştır. Enfeksiyon için risk faktörlerinin değerlendirilmesinde, hastalara ait demografik ve klinik bilgiler hastane bilgi sisteminden taranmıştır.

**Bulgular:** İzole edilen 300 suşun %46'sı yoğun bakım ünitelerinden, %35.3'ü diğer kliniklerde yatan hastalardan, %18.7'si ise poliklinik hastalarından izole edilmiştir. *S. maltophilia* üremesi olan 300 hastadan 64'ünün (%21.3) immünsuprese olduğu görülmüştür. Antibiyotik duyarlılıklarına bakıldığında, trimetoprim-sülfametoksazole %1.3, levofloksasine %0.7 oranında direnç gözlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışmada literatür verilerinden genel olarak daha düşük direnç oranları saptanmıştır. Yoğun bakım ünitesinde yatış ve immünsupresyonun *S. maltophilia* enfeksiyonları için önemli risk faktörleri olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Stenotrophomonas maltophilia*, trimetoprim-sülfametoksazol, levofloksasin

### ABSTRACT

**Objective:** *Stenotrophomonas maltophilia* is an opportunistic pathogen that frequently causes nosocomial infections in recent years. It is generally isolated from respiratory tract samples, blood, urine and drainage materials. Due to multiple antibiotic resistance, a limited number of antibiotics are used in the treatment of these infections. The aim of this study is to investigate the antibiotic resistance status and risk factors in isolated *S. maltophilia* strains.

**Method:** Diversity and antibiotic susceptibility levels of *S. maltophilia* strains isolated from various clinical samples between January 2018 and June 2020 were examined using conventional methods and VITEK2 automated system. Demographic and diagnostic data of the patients were retrieved from the hospital's data base to identify the risk factors of infection.

**Results:** Of the 300 strains examined, 46% were isolated from intensive care units, 35.3% from patients hospitalized in other clinics, and 18.7% from outpatient clinic patients. It was observed that 64 (21.3%) of 300 patients were immunosuppressed. Trimethoprim-sulfamethoxazole resistance was 1.3% and levofloxacin resistance was 0.7%.

**Conclusion:** Resistance rates were found to be lower than the literature data in the study. It was concluded that hospitalization in the intensive care unit and immunosuppression are important risk factors for *S. maltophilia* infections.

**Keywords:** *Stenotrophomonas maltophilia*, trimethoprim-sulfamethoxazole, levofloxacin

**Alındığı tarih / Received:**  
08.03.2021 / 08.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
31.05.2021 / 31.May.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

G.K. Arslan 0000-0002-8571-0639  
F. Esenkaya Taşbent 0000-0003-4190-5095  
M. Doğan 0000-0003-3471-4768

✉ fesentas@hotmail.com

## GİRİŞ

*Stenotrophomonas maltophilia* non-fermentatif, hareketli, katalaz pozitif, oksidaz negatif, Gram negatif bir basildir<sup>(1)</sup>. İlk kez 1943 yılında plevral sıvıdan izole edilen bakteri, düşük virülansa sahip bir mikro-organizma olarak bilinmektedir. Ancak, bakteriyemini geliştiği durumlarda, %14-69 oranında mortaliteye neden olduğu bildirilmektedir<sup>(2)</sup>. Ayrıca son yıllarda artan sıklığı nedeniyle tıbbi alanda önem kazanan bir nozokomiyal enfeksiyon ajanıdır. Fırsatçı bir patojen olarak bilinen *S. maltophilia* enfeksiyonları, mekanik solunum cihazına bağlı yoğun bakım hastalarında ve immünsuprese hastalarda daha sık görülmektedir. Solunum yolu epitel hücrelerini ve tıbbi cihazların yüzeylerini kolonize etme özelliğinin, hastanede yatan hastalarda enfeksiyona/kolonizasyona neden olduğu bildirilmektedir<sup>(3)</sup>. Ayrıca, uzun süreli hastanede yatış ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı enfeksiyon riskini arttırmaktadır<sup>(2)</sup>. *S. maltophilia*'nın neden olduğu yaygın invaziv enfeksiyonlar arasında pnömoni, kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, yara enfeksiyonları bulunmaktadır<sup>(4)</sup>.

*Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisi ile ilgili birçok zorluk vardır. Çok sayıda antimikrobiyal ajana karşı yüksek düzeyde doğal direnç mevcuttur. Beta-laktamaz üretimi, *qnr* genlerinin ekspresyonu, çoklu ilaç-dışa atım pompalarının veya sınıf 1 integronlarının ekspresyonu, düşük membran geçirgenliği, fenotipik değişkenlik (biyofilm üretimi) ve genotipik değişkenlik gibi özellikler direnç gelişimine neden olmaktadır<sup>(5-7)</sup>. Aminoglikozidler, beta-laktamlar, tetrasiklinler gibi birçok antibiyotiğe bu mekanizmalarla direnç gözlenmektedir. Karbapenemler dahil pek çok geniş spektrumlu antibiyotiğe karşı dirençli oluşu tedavi seçeneklerini sınırlandırmaktadır<sup>(6-8)</sup>. Trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT), rehberlerde *S. maltophilia* için birinci basamak tedavi olarak kabul edilmektedir<sup>(9)</sup>.

Bu çalışmada, doğal olarak birçok antibiyotiğe dirençli olup, sınırlı antibiyotik kullanımı olan *S. maltophilia* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ve risk faktörleri retrospektif olarak araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 18.09.2020 tarih ve 116 kayıt numarası ile onaylanmıştır.

Ocak 2018-Haziran 2020 tarihleri arasında, Meram Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, yatarak ve ayakta tedavi edilen hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *S. maltophilia* suşları çalışmaya dahil edilmiştir. Birden fazla örneğinde üreme olan hastaların yalnızca bir suşu çalışmaya alınmıştır. Kan örnekleri otomatize kan kültürü vasatlarına (BD BACTEC PLUS Aerobic/F, BACTEC 9120, Becton, Dickinson and Co, ABD) ekilip inkübe edilmiştir. Otomatize kan kültürü cihazında üreme saptanan şişelerden ve idrar, yara, drenaj, kateter, balgam, steril sıvı gibi diğer şüpheli örneklerden Eosin Methylene Blue (EMB) agara ve kanlı agara ekim yapılarak, 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Üreme olan örneklerde, tipik koloni morfolojisi gösteren, biyokimyasal olarak katalaz pozitif, oksidaz negatif, glukoz ve maltozu okside eden, üreaz ve indol reaksiyonları negatif suşlar diğer gram negatif bakterilerden ayırt edilerek *S. maltophilia* ön tanısı almış ve VITEK2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile doğrulanmıştır.

İzolatların antibiyotik duyarlılığı VITEK 2 otomatize sistemi ile test edilmiştir. TMP-SXT duyarlılığı The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir<sup>(10)</sup>. Levofloksasin için EUCAST önerilerinde klinik sınır değerler bulunmadığı için, VITEK 2 sonuçları 2014 yılı Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, B grubu antibiyotik olarak değerlendirilmiştir<sup>(11)</sup>.

Çalışmada, hastalara ait demografik bilgiler, örneğin geldiği klinik ve tanı bilgileri hastanemiz laboratuvar bilgi sisteminden elde edilmiştir. İmmünsupresif hastaların tanımlanmasında belirgin immünsupresyonu olan gruplar geriye dönük dosyaları irdelenerek saptanmıştır. Konjenital immün yetmezliği olanlar, onkoloji hastalarından kanser kemoterapisi görenler,

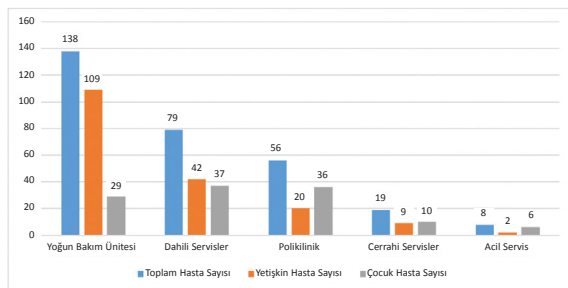
bağıışıklığı baskılayan ilaç kullanan hastalar ve HIV (+) hastalar immünsupresif grup olarak alınmıştır.

Retrospektif olarak, belirtilen zaman aralığındaki laboratuvar verilerinin sunulmasından dolayı etken-kolonizasyon ayrımının yapılamaması çalışmadaki en büyük kısıtlılıktır.

## BULGULAR

Çalışma süresi içerisinde 300 hastada *S. maltophilia* üremesi olmuştur. Çalışmaya dâhil edilen hastaların 198'i (%66.0) erkek, 102'si (%34.0) kadın hastalardır. Çalışmaya alınan hastaların yaşlarının yenidoğandan 92 yaşa kadar değişen büyük bir çeşitlilik gösterdiği gözlenmiştir. Ortalama yaş 45 (medyan yaş 47) olup, hastaların %35'inin (n=106) 60-92 yaş aralığında olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen hastaların 118'i (%39.3) çocuk yaş grubundadır. 118 çocuğun 93'ü (%79) 0-9 yaş aralığında, 25'i (%21) 10-17 yaş aralığında saptanmıştır.

Suşların 244'ü (%81.3) yatan hastalara ait örneklerden, 56'sı (%18.7) poliklinik hastalarına ait örneklerden izole edilmiştir. *S. maltophilia* üremesi olan hastaların 138'inin (%46.0) yoğun bakım ünitesinde, bu hastaların 29'unun (%9.7) ise çocuk yoğun bakım ünitesinde buldukları gözlenmiştir. Hastaların klinik bölümlere göre dağılımları Şekil 1'de özetlenmiştir. Ayrıca üreme görülen 300 hastadan 64'ünün (%21.3) immünsuprese olduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. İzole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının kliniklere göre dağılımı (n).

*Stenotrophomonas maltophilia* en sık olarak bronşiyal lavaj sıvısından izole edilmiş; bunu kan, idrar, drenaj sıvısı, balgam ve diğer klinik materyaller izlemiştir. İzole edilen *S. maltophilia* suşlarının klinik örneklerine göre dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının izole edildikleri örneklerle göre dağılımları.

Örnek tipi	Sayı	Yüzde (%)
Bronşiyal lavaj	151	50.3
Kan	32	10.7
İdrar	29	9.7
Drenaj sıvısı	24	8.0
Balgam	24	8.0
Yara	20	6.7
Boğaz	16	5.3
Kateter	4	1.3
Toplam	300	100.0

Antibiyotik direnç oranları incelendiğinde, TMP-SXT için dört (%1.3), levofloksasin için iki izolatta (%0.7) direnç gözlenmiştir. Hem TMP-SXT hem levofloksasin dirençli olan bir suş idrar örneğinde bulunmuş olup, bu örnek de üroloji servisinde prostat kanseri tanısı ile takip edilen bir hastaya aittir. Levofloksasin dirençli diğer suş ise bir yoğun bakım hastasına ait bronşiyal lavaj sıvısında tespit edilmiştir. TMP-SXT dirençli suşlardan biri hariç tamamı yatan hastalardan izole edilmiştir. TMP-SXT direnci görülen poliklinik hastasının klinik öyküsü irdelendiğinde, bu hastanın meme kanseri nedeniyle kemoterapi alan immünitesi baskılı bir hasta olduğu belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

*Stenotrophomonas maltophilia* içme suyu kaynakları da dâhil olmak üzere, suyun bulunduğu her ortamda veya nemli ortamlarda üreyebilen bir bakteridir. Virulansı yüksek bir patojen olmamasına rağmen, solunum yolu epitel hücrelerini ve tıbbi cihazların yüzeylerini kolonize edebilme yeteneği, onu hastanede yatan hastalar için önemli kılmakta ve ciddi bir fırsatçı patojen olarak karşımıza çıkarmaktadır. Klinikte özellikle balgam, yara yeri gibi steril olmayan bölgelerden alınan örneklerde enfeksiyon-kolonizasyon ayrımı zorken; altta yatan hastalığı olan ve immünitesi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonların sorumlusu olarak daha sıklıkla rapor edilmeye başlanmıştır<sup>(3,12)</sup>. Ülkemizde de hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında kan kültürlerinden izole edilen gram negatif non-fermenter bakteriler arasında ilk üç etkenden biri olması dikkat çekicidir<sup>(13)</sup>.

Hastanede yatış süresinin uzaması, yoğun bakım ünitelerinde yatış, kronik solunum yolu hastalıkları, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, malignensiler, immünsüpresyon, mekanik ventilasyon, kateter girişimleri *S. maltophilia* enfeksiyonları için risk faktörleri olarak rapor edilmiştir<sup>(14)</sup>. Hazırolan ve ark.'nın<sup>(15)</sup> çalışmasında, %37'lik oranla, Güzelant ve ark.'nın<sup>(16)</sup> çalışmasında, %51.9 oranla en sık *S. maltophilia* üremesi görülen klinik yoğun bakım üniteleri olarak bildirilirken; Çaycı ve ark.'nın<sup>(17)</sup> çalışmasında, yoğun bakım ünitelerindeki üreme dahililiye kliniğinden sonra ikinci sıklıkta bildirilmiştir. Ancak, *S. maltophilia* sadece yoğun bakım hastaları için önemli bir etken değildir. Ülkemizde yapılmış çalışmalarda, poliklinik hastalarında *S. maltophilia* üremesinin tespitinde %4.5 ile %18.5 gibi değişen oranlarda artış bildirilmektedir<sup>(15,16)</sup>. Bu çalışmada, yaklaşık iki buçuk yıllık zaman zarfında 300 klinik örnekte *S. maltophilia* üremesi saptanmıştır. *S. maltophilia* suşlarının 244'ü (%81.3) yatan hastalara ait örneklerden saptanmış olup, hastane yatışı önemli bir risk faktörü olarak düşünülmüştür. Örneklerin %46.0'sı (n=138) yoğun bakım hastalarından izole edilmiş, diğer kliniklerle karşılaştırıldığında en yüksek riskin yoğun bakım ünitelerinde yatış olduğu görülmüştür. *S. maltophilia* üremesi tespit edilen hastaların 56'sı (%18.7) poliklinik hastası olup, poliklinik hastalarının %21.4'ünde (n=11) immünsüpresyon mevcuttur. *S. maltophilia* üremesi olan tüm hastalardan 64'ü (%21.3) immünsüprese hasta grubundadır. Çelebi ve ark.'nın<sup>(18)</sup> çocuk hastalarda yaptıkları bir çalışmada, kan kültüründe *S. maltophilia* üremesi olan hastaların %40'ında malignite ve buna buna bağlı immünsüpresyon olduğu bildirilmiştir. İmmünitesi baskılanmış hasta gruplarında *S. maltophilia* enfeksiyonlarının hem antimikrobiyal direnç oranlarının hem de mortalite oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir<sup>(12)</sup>.

*Stenotrophomonas maltophilia*'ya bağlı enfeksiyonlarda ileri yaş da olası risk faktörlerinden biri olarak görülmektedir. Biswas ve ark.'nın<sup>(19)</sup> yaptığı çalışmada, *S. maltophilia* izole edilen hastaların %33.7'sinin 61-80 yaş aralığında olduğu bildirilmiştir. Fihman ve ark.'nın<sup>(20)</sup> çalışmasında ise, 158 hastanın yaş ortalamasının 62.7 olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda,

hastalar yaşlarına göre değerlendirildiğinde, hastaların yaş ortalaması 45 iken, %35'nin 60-92 yaş aralığında olduğu görülmüştür. Ancak, *S. maltophilia* ileri yaş grubunun yanı sıra çocuk yaş grubunda da önemli bir hastane enfeksiyonu etkeni olarak bildirilmektedir. Gür ve ark.'nın<sup>(13)</sup> çalışmasında, çocuk servislerinden gelen kan kültürü örneklerinde en sık izole edilen nonfermantatif gram (-) bakteri *S. maltophilia* olmuştur. Türk Dağı ve ark.'nın<sup>(21)</sup> çalışmasında, kan kültürlerinden izole edilen *S. maltophilia* suşlarının kliniklere göre dağılımında ilk sırayı %41'lik oranla çocuk klinikleri almıştır. Bir diğer çalışmada<sup>(22)</sup> da hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *S. maltophilia* suşlarının %45'inin çocuk hastalara ait olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda, çocuk hasta oranlarına bakıldığında tüm hastaların %39.3'ü çocuk hastalardan oluşmaktadır.

*Stenotrophomonas maltophilia* başta akciğer enfeksiyonları olmak üzere, bakteriyemi, yumuşak doku ve cilt enfeksiyonları, üriner enfeksiyonlar gibi birçok sistemik enfeksiyona neden olabilmektedir<sup>(23)</sup>. SENTRY antimikrobiyal surveyans program raporunda Latin Amerika'da ilk on pnömoni etkeninden biri olarak bildirilmiştir<sup>(24)</sup>. Literatürde *S. maltophilia*'nın en sık izole edildiği örnek tipi solunum yolu örnekleridir. *S. maltophilia* Insuwanno ve ark.'nın<sup>(25)</sup> yaptığı çalışmada da en sık solunum yolu, ikinci sıklıkla kan örneklerinden; Çaycı ve ark.<sup>(17)</sup> ve Zer ve ark.<sup>(14)</sup> çalışmalarında ise, en sık solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. *S. maltophilia*'nın neden olduğu solunum yolu enfeksiyonlarının yaygınlık oranı literatürde 1997-2004 döneminde %3-3.5 iken, 2009-2012 döneminde %4.4'e yükseldiği rapor edilmiştir<sup>(4)</sup>. Çalışmamızda ise, *S. maltophilia* üremesi olan örneklerin %50.3'ü solunum yolu, %10.7 ise kan örnekleri idi. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ile literatür verileri uyumlu bulunmuştur.

*Stenotrophomonas maltophilia* birçok antibiyotiğe doğal dirençli olup tedavide sınırlı sayıda antibiyotik kullanılabilmektedir<sup>(17)</sup>. Yapılan çalışmalarda, *S. maltophilia*'ya in vitro olarak en etkin antibiyotiğin TMP-SXT olduğu bildirilmiştir<sup>(26,27)</sup>. Tedavi seçenekleri arasında levofloksasin de yer almaktadır<sup>(11)</sup>. Çoklu ilaç direncine sahip bir patojen olan *S. maltophilia*

için tedavi seçeneklerinin sınırlı olması direnç artışına karşı dikkatli olunmasını gerektirmektedir. Sonuç olarak, ülkemizde farklı hastanelerde yapılan çalışmalar direnç artışına dikkat çekmektedir<sup>(8,15)</sup>. Hazırolan ve ark.'nın<sup>(15)</sup> çalışmasında, *S. maltophilia* enfeksiyonlarının yıllar içindeki durumu irdelenmiştir. Söz konusu çalışmada 2008 yılında yalnızca beş örnekte *S. maltophilia* üremesi görülürken 2015 yılında 81 örnekte *S. maltophilia* izole edildiği; ayrıca yıllar içinde suşların direnç oranlarında artış olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalarda TMP-SXT ve levofloksasine karşı oldukça farklı direnç oranları bildirilmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinden bildirimler incelendiğinde, TMP-SXT'ye Meksika'dan %25, Macaristan'dan %16, Sırbistan'dan %9.4, Hindistan'dan %6.2 gibi yüksek direnç oranları bildirildiği görülmektedir<sup>(4,19,28,29)</sup>. 2014 yılında, SENTRY antimikrobiyal sürveyans program raporunda Amerika Birleşik Devletleri'nde *S. maltophilia* üremesi olan 302 hastada TMP-SXT'e %3.7 oranında direnç bildirilmiştir<sup>(30)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, *S. maltophilia* izolatlarında TMP-SXT direnci %4 ile %13.2 arasında değişmektedir<sup>(8,15-17,26)</sup>. Zer ve ark.'nın<sup>(14)</sup> çalışmasında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 74 *S. maltophilia* suşunda TMP-SXT direnci yalnızca %2.7 olarak saptanmıştır. Şen ve ark.'nın<sup>(31)</sup> çalışmasında ise, %1 oranında TMP-SXT direnci rapor edilmiştir. Öngüt ve ark.'nın<sup>(32)</sup> yaptığı çalışmada, izole edilen 36 suşun tamamı TMP-SXT'e duyarlı bulunmuştur. Bir başka çalışmada da Madi ve ark.<sup>(5)</sup> TMP-SMX'e duyarlılık oranını %100 bulmuşlardır. Çıkman ve ark.'nın<sup>(33)</sup> 118 *S. maltophilia* suşunu dâhil ettikleri çalışmalarında ise, %20.3 ile literatür verilerinden yüksek bir oranda TMP-SXT direnci bildirilmiştir. Farklı direnç oranlarının bildirilmesinin nedeni olarak, kolonizasyon-enfeksiyon ayrımının laboratuvar ortamında yapılamaması olduğunu düşünmekteyiz.

Birçok çalışmada, *S. maltophilia* enfeksiyonlarında TMP-SXT'den sonra en etkili antibiyotik levofloksasin olarak bildirilmiştir<sup>(30,31)</sup>. *S. maltophilia*'da levofloksasin için Çin'de %19.6, Macaristan'da %9, Tayland'ta %6, Meksika'da %2.6 oranında direnç saptanmış-

tır<sup>(4,25,28,34)</sup>. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda, %7.6-23.8 arasında levofloksasin direnci rapor edilmiştir<sup>(3,4,9,22,23)</sup>. Ancak, TMP-SXT için olduğu gibi, levofloksasin için de bazı çalışmalarda düşük direnç oranları bildirilmiştir<sup>(5)</sup>.

Çalışmamızda, *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli seçenekler olan TMP-SXT ve levofloksasin için direnç oranları sırasıyla %1.3 ve %0.7 olarak bulunmuştur. Hastanemizdeki direnç oranlarının düşük olma nedeninin klinik ortamda etken/kolonizasyon ayrımının hastaların genel durumu, ateş, lökositöz gibi enfeksiyöz parametreleri değerlendirilerek yapılması, antibiyotik kullanım protokollerinin etkin şekilde uygulanması gibi uygun antibiyotik kullanım politikalarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda, literatürdeki diğer çalışmaları destekleyen şekilde yoğun bakım ünitesinde yatış ve immünsupresyon durumu izole edilen *S. maltophilia* suşları için önemli risk faktörleri olarak görülmüştür.

Laboratuvar ortamında etken/kolonizasyon ayrımını yapmak olası olmamaktadır. Hastanın klinik durumu ile ilişkilendirerek tedavi başlanması; hem antibiyotik direnç artışının önüne geçmekte hem de etkenin yayılımını engellemektedir<sup>(5)</sup>. Sonuç olarak, özellikle risk grubundaki hastalarda, sınırlı antibiyotik seçeneği olan *S. maltophilia* enfeksiyonları için dikkatli olunmalıdır. *S. maltophilia* suşlarının hem yoğun bakım hem de poliklinik hastalarında izole edilmesinin yanı sıra özellikle ileri yaş ve çocuk yaş grubunda da izole edilmesi *S. maltophilia* enfeksiyonlarına karşı uyarıcı niteliktedir. Bu nedenle bu etkene karşı enfeksiyonun kontrol ve önemi için gerekli önlemler alınmalıdır.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 18.09.2020 tarih ve 116 kayıt numarası ile onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Necmettin Erbakan

University, Meram Medical Faculty Ethics Committee (09.19.2020/116).

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

#### KAYNAKLAR

1. Brooks G, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. O. Şadi Yenen (Çeviri Ed.) Ankara: Nobel Tıp Kitapları, 2014.
2. Senol E. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. J Hosp Infect. 2004;57(1):1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.01.033>
3. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. Lancet Infect Dis. 2009;9(5):312-23.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70083-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0)
4. Anđelković MV, Janković SM, Kostić MJ, et al. Antimicrobial treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* invasive infections: Systematic review. J Chemother. 2019;31(6):297-306.  
<https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1620405>
5. Madi H, Lukić J, Vasiljević Z, et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* strains from a pediatric tertiary care hospital in Serbia. PloS one. 2016;11(10):e0165660.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165660>
6. Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh P-R. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. Front Microbiol. 2015;6:893.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00893>
7. Nicodemo A, Paez JG. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26(4):229-37.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-007-0279-3>
8. Özkaya E, Aydın F, Bayramoğlu G, Buruk CK, Sandalli C. Klinik örneklerden izole edilen trimetoprim-sülfametoksazole dirençli *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında integron, sul1-2 ve dfr genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2014;48(2):201-12.  
<https://doi.org/10.5578/mb.7262>
9. Abbott IJ, Peleg AY. *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and nonmelioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(1):99-110.  
<http://doi.org/10.1055/s-0034-1396929>
10. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST Documents Ver. 8.1, 2018.
11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth informational supplement update. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne:PA, 2014.
12. Safdar A, Rolston KV. *Stenotrophomonas maltophilia*: changing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. Clin Infect Dis. 2007;45(12):1602-9.  
<https://doi.org/10.1086/522998>
13. Gür H, Hazirolan G. Kan kültürlerinden izole edilen nonfermentatif ID Gram negatif bakterilerin dağılımının ve antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi. ANKEM Derg. 2019;33(2):49-57.  
<https://doi.org/10.5222/ankem.2019.1915>
14. Zer Y, Karaoğlu İ, Çevik S, Erdem M. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının irdelenmesi. Klinik Derg. 2009;22(1):21-4.
15. Hazirolan G, Araz H, Çelikbaş AK, Aksu N. Dikkat! Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının trimetoprim-sülfametoksazol ve levofloksasin direncinde belirgin artış var (2008-2016). Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2018;48(2):134-40.  
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.134>
16. Güzelant A, Kaya M, Güvenç Hİ ve ark. Çeşitli klinik örneklerden beş yılda izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2014;44(2):75-9.  
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2014.075>
17. Çaycı Y, Karadağ A, Yılmaz H, Yanık K, Günaydın M. *Stenotrophomonas maltophilia* klinik suşlarında antimikrobiyal direnç. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2013;43(1):22-5.  
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2013.022>
18. Çelebi S, Kavurt S, Hacimustafaoglu M. Çocuklarda hastaneden edinilmiş *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonları: Beş yıllık çalışma sonuçları. Çocuk Enf Derg. 2008;3(2):100-4.
19. Biswas S, Berwal A, Chawla K. A prospective study of microbiological characterization and clinical facets of *Stenotrophomonas maltophilia* infections. Iran J Microbiol. 2020;12(4):313-8.  
<https://doi.org/10.18502/ijm.v12i4.3934>
20. Fihman V, Le Monnier A, Corvec S, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* - the most worrisome threat among unusual non-fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: a prospective multicenter study. J Infect. 2012;64(4):391-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.01.001>
21. Türk Dağı H, Arslan U, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik direnci. ANKEM Derg. 2011;25(1):27-30.  
<https://doi.org/10.5222/ankem.2011.27>

22. Dülger D, Berktaş M, Bozkurt H, Güdücüoğlu H, Mısırlıgil A. Nozokomiyal *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. Van Tıp Derg. 2006;13(2):49-52.
23. Liu YM, Chen YS, Toh HS, et al. In vitro susceptibilities of non-Enterobacteriaceae isolates from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region from 2003 to 2010: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Int J Antimicrob Agents. 2012;40(Suppl 1):S11-7. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(12\)70004-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(12)70004-3)
24. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(4):354-60. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
25. Insuwanon W, Kiratisin P, Jitmuang A. *Stenotrophomonas maltophilia* infections: Clinical characteristics and factors associated with mortality of hospitalized patients. Infect Drug Resist. 2020;(13):1559-66. <https://doi.org/10.2147/IDR.S253949>
26. Arabacı Ç, Yanılmaz Ö, Uzun B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2019;33(2):58-64. <https://doi.org/10.5222/ankem.2019.198>
27. Jones RN, Sader HS, Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). Int J Antimicrob Agents. 2003;22(6):551-6. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00245-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00245-0)
28. Gajdács M, Urbán E. Prevalence and antibiotic resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory tract samples: a 10-year epidemiological snapshot. Health Serv Res Manag Epidemiol. 2019;6:1-9. <https://doi.org/10.1177/2333392819870774>
29. Rodríguez-Noriega E, Paláu-Davila L, Maldonado-Garza HJ, Flores-Treviño S. Risk factors and molecular mechanisms associated with trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico. J Med Microbiol. 2017;66(8):1102-9. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000550>
30. Sader, Helio S, Farrell DJ, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. Int J Antimicrob Agents. 2014;43(4):328-34. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.025>
31. Şen P, Yula E, Er H ve ark. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında antibiyotiklere direnç oranı. Ortadoğu Tıp Derg. 2017;9(3):113-7. <https://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.265431>
32. Öngüt G, Özcan A, Kandişer A, Öğünç D, Colak D, Gültekin M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının E test ile araştırılması. Infeksiyon Derg. 2005;19(4):425-8.
33. Çıkman A, Parlak M, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Berktaş M. Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical species. Afr Health Sci. 2016;16(1):149-52. <https://doi.org/10.4314/ahs.v16i1.20>
34. Hu LF, Chen GS, Kong QX, et al. Increase in the prevalence of resistance determinants to trimethoprim/sulfamethoxazole in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates in China. PLoS One. 2016;11(6):e0157693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157693>

# Tek Sağlık Yaklaşımında Multidisipliner Uygulamalı Antibiyotik Duyarlılık Testi Eğitimi: ANADOLU PROJESİ

## Multidisciplinary Applied Antibiotic Sensitivity Testing Training in the One Health Approach: ANATOLIAN PROJECT

Serap Süzük Yıldız\*<sup>®</sup>, Banu Kaskatepe\*\*<sup>®</sup>, Özlem Ünalıd<sup>®</sup>, Hüsnüye Şimşek\*<sup>®</sup>, Zeynep Ceren Karahan\*\*\*<sup>®</sup>  
Selçuk Kılıç\*<sup>®</sup>, Deniz Gür\*\*\*\*<sup>®</sup>

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

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

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

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

**Atf/Cite as:** Süzük Yıldız S, Kaskatepe B, Ünalıd Ö, ve ark. Tek sağlık yaklaşımında multidisipliner uygulamalı antibiyotik duyarlılık testi eğitimi: Anadolu projesi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):341-7.

### Öz

**Amaç:** Antibiyotik direnci insan-hayvan ve çevre ekosistemlerinin ortak en önemli sorunlarından biridir. Antibiyotik direncinin yönetiminde entegre sürveyans sistemlerinin oluşturulması ve direncin izlenmesi önemlidir. Farklı disiplinlerden elde edilecek antibiyotik direnç verilerinin standardizasyonu veri kalitesini arttırmada kilit noktadır. Bu amaçla, ülkemizde insan hayvan ve çevre sektörlerinden elde edilecek direnç verilerini standardize etmek için farklı disiplinlerden profesyonellere ortak bir antibiyotik duyarlılık testi eğitim programı hazırlanmış ve uygulanmıştır.

**Yöntem:** Beş günlük bir eğitim programına 3 dönem hâlinde toplam 48 kişi katılmıştır. Her bir dönemde farklı meslek gruplarından 4 kişilik 4 küçük grup oluşturulmuştur. Katılımcılara antibiyotik duyarlılık testlerinde kalite kontrol, fenotipik testler, genotipik testler ile direnç verilerinin kullanımı ile ilgili eğitim verilmiştir. Katılımcılar tüm testleri kendilerine verilen izolatlara ile çalışmışlardır. Katılımcılara ön test ve son test uygulanmıştır. Her küçük grup eğitim programının sonunda tek sağlık yaklaşımında antibiyotik direncine yönelik proje hazırlayıp sunmuşlardır.

**Bulgular:** Eğitime tıp, veteriner, eczacılık, gıda ve çevre alanlarında antibiyotik duyarlılık testi çalışan lisans üstü toplam 48 kişi katılmıştır. Ön test ve son testte ortalama doğru yanıt verme sayısı Nisan döneminde 4.8'den 10.5'e, Haziran grubunda 4'ten 9'a, Eylül döneminde ise 3.4'ten 8.5'e çıkmıştır. Kendilerine verilen izolatlarda fenotipik ve genotipik testleri eğitmenlerin gözetiminde çalışmışlardır. Katılımcılardan alınan geri bildirimlerden, eğitimin farklı meslek grupları ile bir arada olmasının direnç sorununa daha geniş bir perspektiften bakabilme fırsatı buldukları saptanmıştır.

**Sonuç:** Ülkemizde bu eğitim programının yaygınlaştırılması planlanmaktadır. Ayrıca, tüm dünyada benzer eğitimlerin hazırlanıp uygulanmasının direnç verisinin standardizasyonuna bir bakış açısı kazandıracağı kanısındayız. Bu eğitimlerin lisans ve lisans üstü düzeylerde yaygınlaştırılmasının Tek sağlık yaklaşımının da yaygınlaşmasına olanak sağlayacağını düşünüyoruz.

**Ahtar kelimeler:** Tek sağlık, antibiyotik direnci, antibiyotik duyarlılık testleri

### ABSTRACT

**Objective:** Antibiotic resistance is one of the most significant problems of human-animal and environmental ecosystems. It is crucial to establish integrated surveillance systems and monitor resistance for the management of antibiotic resistance. Standardization of antibiotic resistance data obtained from various disciplines is the critical point in enhancing the data quality. To realize this objective, a common antibiotic susceptibility testing training program was prepared and performed for professionals from various disciplines to standardize the resistance data to be obtained from the human, animal, and environmental sectors in our country.

**Method:** A total of 48 individuals participated in a five-day training program in three terms. In each period, four small groups, each consisting of four people from a group of different professions, were generated. Participants were trained on quality control, phenotypic tests, genotypic tests, and the use of resistance data in antibiotic susceptibility testing. Pre-test and post-tests were applied to the participants.

**Results:** Individuals with a postgraduate degree who studied antibiotic susceptibility testing in the fields of medicine, veterinary medicine, pharmacy, food, and environment participated in the training. The average number of correct answers in the pre-test and post-test increased from 4.8 to 10.5 in April, from 4 to 9 in June and from 3.4 to 8.5 in September. They studied phenotypic and genotypic tests in the supplied isolates under the supervision of the educators.

**Conclusion:** We presume that dissemination of the training at graduate and postgraduate levels will also enable the One-Health approach to become widespread. In addition, worldwide application of similar trainings will help standardization of resistance data, as well as one health approach.

**Keywords:** One health, antibiotic resistance, antibiotic susceptibility tests

**Alındığı tarih / Received:**  
12.04.2021 / 12.April.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
01.06.2021 / 01.June.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

S. Süzük Yıldız 0000-0002-4820-6986  
B. Kaskatepe 0000-0002-9722-4267  
Ö. Ünalıd 0000-0002-5560-6558  
H. Şimşek 0000-0003-1723-5837  
Z.C. Karahan 0000-0001-7727-3363  
S. Kılıç 0000-0002-4993-650X  
D. Gür 0000-0002-7504-8450

✉ serapsuzuk@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

Antibiyotik direnci günümüzde en önemli küresel halk sağlığı sorunlarından biridir. Antibiyotiklerin aşırı ve akılcı olmayan kullanımları antibiyotik direnci gelişimindeki ana faktörlerden biridir. Antibiyotikler, hem insan hem hayvan sağlığı için kullanılan önemli bir ilaç grubu olmasının yanı sıra doğada bir çok bakteri ve mantar tarafından üretilmekte ve bakteriler antibiyotiklere sürekli olarak maruz kalmaktadır. Bu nedenlerden dolayı dirençli bakteriler ve direnç genleri sürekli olarak insan-hayvan-çevre ekosistem döngüsünde yer almaktadır<sup>(1)</sup>. Antibiyotik direncinin olumsuz sonuçları net olarak yüksek mortalite, morbidite ve artan maliyetler ile insan sağlığında görülmektedir. Tek başına tıp alanında yapılan çabalar ise direncin yönetiminde yetersiz, daha doğrusu eksik kalmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise antibiyotik direncinde ulusal bazda yapılan önleme stratejilerin bölgesel hatta küresel bazda yaygınlaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, antibiyotik direncinin yönetiminde uluslararası ve çok sektörlü bir yaklaşıma gereksinim duyulmaktadır<sup>(2)</sup>. Antibiyotik direncine benzer olarak zoonotik hastalıklar ve gıda kaynaklı enfeksiyonlarda da benzer bir yaklaşıma gereksinim vardır. Burada gereksinim duyulan tek sağlık yaklaşımıdır. Tek sağlık; insan-hayvan-çevre üçlüsünde potansiyel ya da mevcut risklerin değerlendirilmesinde ve yönetilmesinde çok paydaşlı bir yaklaşımı barındırmaktadır. Tek sağlık yaklaşımı insan sağlığı, hayvan sağlığı ve çevre sağlığı arasındaki bağlantılara odaklanıp sorunların bir bütün olarak değerlendirilmesini öneren bir yaklaşımdır. Böyle bir yaklaşım aslında eski antik dönemlerden beri süregelen bir yaklaşımdır<sup>(3)</sup>. Özellikle *mcr-1* direnç genlerinin tanımlanmasıyla antibiyotik direncinin yönetiminde de tek sağlık yaklaşımı daha büyük bir önem kazanmıştır<sup>(4)</sup>.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2014 yılında yayınladığı rapor ile antibiyotik direncinin küresel bir halk sağlığı tehdidi olduğunu ve dünya genelinde önlemlerin alınması gerektiğini ortaya koymuştur<sup>(5)</sup>. Bunun üzerine DSÖ, 2015 yılında tek sağlık yaklaşımına sahip

küresel eylem planını yayınlamış ve dünya genelinde uygulanması gereken aktiviteleri belirlemiştir. Bu eylem planında insan sağlığı, hayvan sağlığı ve tarım uygulamalarında tüketicilerin yanı sıra farklı kitleleri hedefleyen halkla iletişim programları aracılığıyla antimikrobiyal direnç konusunda farkındalık yaratmak, davranış değişikliğini teşvik etmek ve erken yaşlardan itibaren doğru bir anlayış ve farkındalık yaratacak antibiyotik direnci ile ilgili konuların eğitim-öğretim programlarına eklenmesi önerilmektedir. Bu stratejik hedefte ayrıca antibiyotik direnci konusunda profesyonellerde de farkındalık oluşturacak eylemlerin ulusal ve uluslararası düzeyde ortaya konması gerekliliği belirtilmektedir<sup>(6)</sup>.

Ülkemizde insan sağlığı bazında ulusal antibiyotik direnç sürveyans sistemi, ulusal enterik patojenler sürveyans sistemi, tüberküloz direnç sürveyans sistemi ve sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonlar sürveyans sistemleri direnç hakkında ulusal düzeyde veri toplamaktadır. Özellikle ayaktan tüketim sürveyans sistemi ile birinci basamakta antibiyotik tüketim verileri izlenmektedir. Bunun dışında ulusal kanatlılarda salmonella sürveyans sistemi ve veteriner sağlık hizmetlerinde tüketim verilerinin takip edildiği bir sürveyans sistemi oluşturulmuştur. Türkiye’de tüm bu sürveyans sistemlerinden elde edilen veriler doğrultusunda antibiyotik direnci ve tüketim oranlarının çok yüksek olduğu bilinmektedir. DSÖ’nün hazırladığı küresel eylem planı baz alınarak ülkemizin önceliklerine yönelik ulusal bir eylem planı hazırlanmıştır. Bu eylem planında bulunan, profesyonellerde farkındalığın artırılması yönünde bir stratejik hedef kapsamında çeşitli aktiviteler belirlenmiştir. Ülkemizde ayrıca hem insan hem de hayvan sağlığından elde edilen direnç verilerini içerecek şekilde ortak bir direnç raporuna gereksinim duyulmaktadır. Bu kapsamda, farklı disiplinlerde çalışılan antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasında ve değerlendirmesinde standardizasyonu sağlamak, elde edilecek ulusal veri kalitesini arttırmak ve ülke genelinde antibiyotik duyarlılık testi çalışan tüm laboratuvarlarda standardizasyonu sağlamak için pilot bir eğitim programının hazırlanması ve uygulanması amaçlanmıştır. Bu pilot eğitimde lisans üstü, tıp, veteriner, çevre, eczacılık ve gıda gibi farklı sektörde çalışan profesyo-

neller arasında ortak bir dil oluşturulması hedeflenmiştir. Bu eğitim, ülkemizde antibiyotik direnci konusunda bu kadar farklı disiplinleri bir araya getiren ilk eğitim programı olup, ilerleyen yıllarda uygulamalı eğitimlerin devamlılığının sağlanması planlanmaktadır. Eğitim, farklı disiplinlerden lisans üstü eğitim gören kişilerde antibiyotik direnci sorunlarına küresel çözümler hakkında yenilikçi düşünmeye teşvik etmek için tasarlanmış olup, bu eğitim programının, üniversitelerde ve enstitülerde farklı disiplinlerden lisans üstü öğrencilerin katılacağı eğitim-öğretim programının hazırlanmasına katkı sağlamasını bekliyoruz.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Eğitimcilerin belirlenmesi:** Eğitim, Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü bünyesinde bulunan Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı tarafından organize edilmiştir. Laboratuvarında çalışılan antibiyotik duyarlılık testleri ISO 15189 tarafından akreditedir. Eğitimcilerin dördü, bu laboratuvarında akredite fenotipik ve genotipik testleri uygulayan personel tarafından seçilmiştir.

Diğer dört eğitimci ise, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'ın Türkiye odak noktası olan Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Antibiyotik Duyarlılık Testleri Standardizasyonu Çalışma grubu üyelerinden seçilmiştir.

**Katılımcıların belirlenmesi:** Katılımcılar, ülke genelinde üniversitelerin ya da enstitülerin tıp, veteriner hekimlik, eczacılık, gıda ve çevre konularında lisans üstü eğitim gören ve çalışma konusu antibiyotik direnci olan kişilerden seçilmiştir. Proje kapsamında üç eğitim dönemi hazırlanmış ve her bir eğitim döneminde 16 kişi eğitime davet edilmiştir. Farklı disiplinlerden gelen katılımcıları içerecek şekilde katılımcılar 4 gruba ayrılmıştır. Şehir dışından gelen katılımcılar için konaklama hizmeti de verilmiştir.

**Eğitim programı:** Proje kapsamında üç eğitim dönemi belirlenmiş olup, eğitimler, 8-12 Nisan 2019, 17-21 Haziran 2019 ve 23-27 Eylül 2019 tarihlerinde verilmiştir. Her bir eğitim dönemi 5 günlük olarak hazırlanmıştır. Her eğitim döneminin başında katılımcılara oryantasyon ve biyogüvenlik eğitimi verilmiştir. Her gün için bir tema belirlenmiş ve o temaya uygun

Tablo 1. Tek sağlık yaklaşımında uygulamalı antibiyotik direnci eğitim programı.

Gün	Dersler	Amaç	Kazanım
1	Genel bilgiler ve kalite kontrol	Antibiyotik duyarlılık testlerinde kalite kontrol testlerini tanıtmak	Kalite kontrol testlerini tanımlar Kalite kontrol testlerini uygular Besiyerlerinin kalite kontrolünü denetler Olası sorunlar hakkında fikir yürütür
2	Fenotipik testler	Fenotipik testleri yapmak	Fenotipik testler için gerekli malzemeleri listeler Fenotipik test sonuçlarını değerlendirir Disk difüzyon ve dilüsyon testleri arasındaki ayrımı yapar Fenotipik testleri değerlendirir Fenotipik testlerde olası sorunlar için çözüm önerisi geliştirir
3	Genotipik Testler	Genotipik testleri yapmak	Genotipik test için gerekli malzemeleri listeler Genotipik test çalışma prosedürünü planlar Genotipik test sonuçlarını değerlendirir Fenotipik test sonuçlarını, genotipik test sonuçları ile ilişkilendirir Yaşanması olası sorunlara yönelik çözüm önerileri geliştirir
4	Direnç verilerinin kullanımı	Sürveyans sistemlerinin işleyişini öğrenmek	Antibiyotik direnç sürveyans sistemlerinin bileşenlerini listeler Tek sağlık yaklaşımında bir raporun önemini kavrar Antibiyotik duyarlılık testinde elde edilen sonuçları sürveyansın veri kalitesi ile ilişkilendirir Tek sağlık yaklaşımındaki raporun sonuçlarını yorumlar
5	Proje hazırlama ve sunumu	Tek sağlık yaklaşımında multidisipliner proje hazırlamak	Proje ekibini oluşturur Tek sağlık yaklaşımında proje planlar Projenin önemini, konusunu, yöntemini özetler ve sunar Diğer projeleri değerlendirir ve puanlar

dersler ve uygulamalar hazırlanmıştır. Öğleden önceki saatlerde teorik dersler interaktif oturumlar ve anahtar sorular ile eğiticiler tarafından verilmiştir. Günün ikinci yarısında ise dağıtılan izolat ve senaryolarla katılımcılar eğitimcilerin gözetiminde ilgili testleri çalışmışlardır. Son gün tek sağlık yaklaşımında grup elemanlarını içerecek şekilde multidisipliner bir proje hazırlayıp sunmaları istenmiştir. Eğitim programı Tablo 1’de sunulmuştur.

**Ölçme değerlendirme:** Katılımcılara eğitim programı öncesi ve sonrası ön test-son test uygulanmıştır. Her gün ve her eğitimi ve eğiticileri değerlendirmek üzere likert ölçeği kullanılmıştır. Ayrıca açık uçlu sorular ile katılımcıların eğitim hakkındaki değerlendirmeleri alınmıştır. Her eğitim günü sonunda oyun tabanlı günlük değerlendirmeler yapılmıştır. Her eğitim döneminin son günü, dört kişilik gruplar hazırladıkları projeleri sunmuşlardır. Katılımcılar farklı disiplinleri içerecek şekilde tek sağlık yaklaşımında antibiyotik direncini kontrol etmeye ve direnci azaltmaya yönelik projelerini sunmuşlardır. Proje sunumunda; projenin adı, özgün değeri, ekibi, yöntemi ve etki değerini sunmaları istenmiştir. Sunulan projeleri, diğer üç grup belirtilen başlıklarda değerlendirmişler ve her bir başlık için 1-10 arasında puan vermişlerdir.

**Eğitim sonrası değerlendirme:** Eğitimden 15 gün sonra katılımcılara iki izolat gönderilmiş ve izolatları kendi

laboratuvarların alt yapısına uygun olarak tanımlamalarını, antibiyotik duyarlılık testlerini ve varsa mevcut direnç genlerini saptamaları istenmiştir.

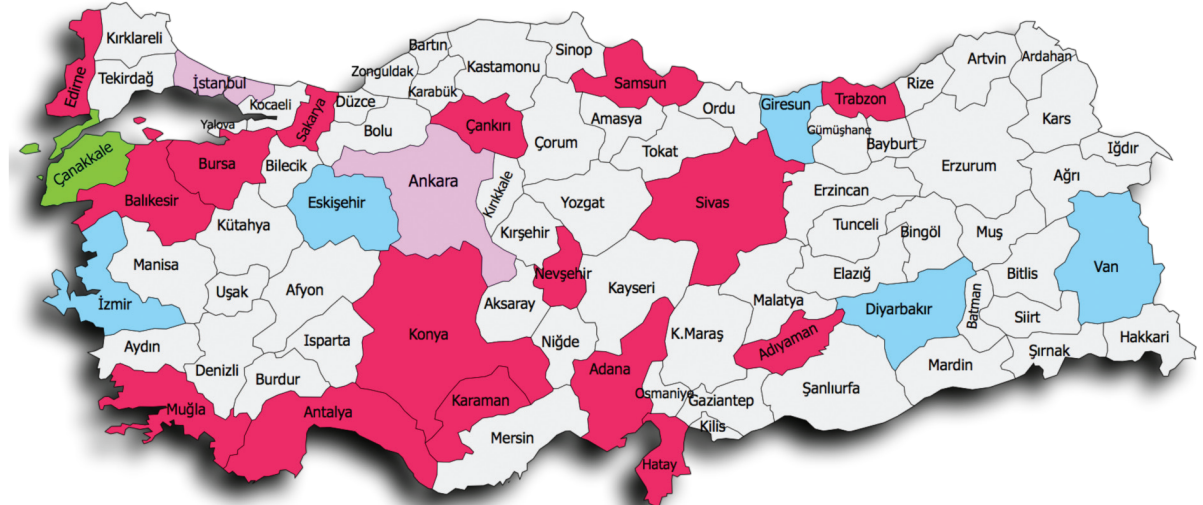
## BULGULAR

Katılımcıların 37 (%77.1)’si kadın, 11 (%22.9)’i erkek idi. Katılımcıların meslek grupları ve öğrenim durumları Tablo 2’de, katılımcıların illere göre dağılımı ise Şekil 1’de verilmiştir.

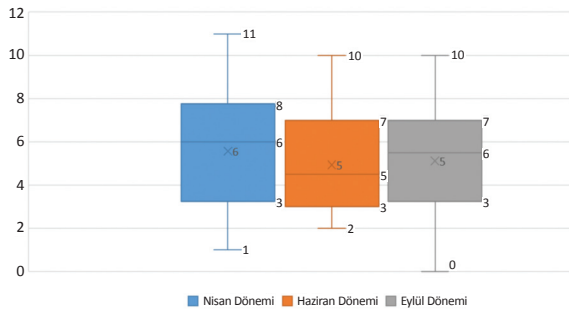
**Tablo 2. Katılımcıların meslek ve öğrenim durumları.**

Meslek Grubu	Katılımcı Sayısı (%)	Yüksek Lisans	Doktora öğrenimi	Postdoktora
Çevre Mühendisi	2 (4.2)	1	1	1
Biyolog	6 (12.5)	1	2	3
Farmasötik Mikrobiyolog	8 (16.7)		5	2
Veteriner Mikrobiyolog	10 (20.8)		4	6
Tıbbi Mikrobiyolog	10 (20.8)	2	8	2
Gıda Mühendisi	12 (25.0)		3	7
Toplam (%)	48 (100)	4 (8.3)	23 (47.9)	21 (41.8)

Ön test ve son test ve sonuçları: Her üç grup içinde eğitimin ön test ve son test sonuçlarına göre puanlarında artış belirlenmiştir. Katılımcıların son test ön test puan farklarının dağılımı Şekil 2’de gösterilmiştir. Ön test ve son testte ortalama doğru yanıt verme sayısı Nisan döneminde 4.8’den 10.5’e, Haziran grubunda 4’den 9’a, Eylül döneminde ise 3.4’ten 8.5’e çıkmıştır.



**Şekil 1. Katılımcıların illere göre dağılımı (Kırmızı=1; Mavi=2; Yeşil=3; Pembe=9 katılımcı).**



Şekil 2. Katılımcıların son test ön test puan farklarının dağılımı.

Likert tipi ölçek ile eğitimcilerin konu hakkında bilgi düzeylerinin yeterli ve anlatım şekillerinin uygun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, eğitim programının kendi eğitimleri ile yakından ilişkili ve uygulamalarında kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Açık uçlu sorularda ise özellikle ilk kez multidisipliner eğitime katılıklarını, bu tip eğitimlerin ülkemiz için yaygınlaştırılması gerektiğini, bu eğitimde edindikleri networkü çalışmalarında kullanabileceklerini, tek sağlık yaklaşımının antibiyotik direnci bakışındaki çerçeveleri uygulamalı olarak net olarak görebildiklerini belirtmişlerdir. Özellikle kalite kontrol testlerine eğitim programında yer verilmesi olumlu olarak karşılanmış ve çalışmalarında uygulamalarının önemini kavramış olduklarını söylemişlerdir. Eğitimin, ülke genelinde farklı merkezlerde planlanması ve bu şekilde daha fazla kişiye ulaşılacağı bildirilmiştir.

**Proje değerlendirme:** Tek sağlık yaklaşımında farklı disiplinleri içerecek şekilde hazırlanan projelerin diğer katılımcılar ve eğitimciler tarafından değerlendirilmiştir. Hazırlanan tüm projeler multidisipliner olarak hazırlanmış ve antibiyotik direncinin farklı disiplinlerde önlenmesine yönelik yenilikçi stratejiler ortaya konduğu görülmüştür.

**Posta ile gönderilen izolatların değerlendirme:** Katılımcılara standart suşlar gönderilmiştir. Ancak, görüldüğü kadarıyla ülke genelinde antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasında standardizasyonun yeterli olmadığı, birçok laboratuvarın alt yapısının yetersiz olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle elde edilen sonuçlardan bir değerlendirme yapılamamıştır.

## TARTIŞMA

Antibiyotik direnci dünya ekonomisi üzerinde en etkili olan halk sağlığı sorunlarından biridir. Türkiye, antibiyotiklerin çok fazla tüketildiği ve direnç oranlarının yüksek olduğu bir ülkedir. Ülke genelinde tek sağlık yaklaşımını temel alan antibiyotik direncini önleme stratejileri geliştirilmiştir. Antibiyotik direncine yönelik alınacak önlemlerin, insan, hayvan ve çevre sağlığı dikkate alınarak hazırlanması gerekmektedir. Ülkemizde özellikle insan ve hayvan sektörlerinde sürveyans verileri olmasına rağmen, ortak bir sürveyans verisi bulunmamaktadır. Bilindiği üzere, sürveyans sistemlerinde veri kalitesi önemli bir faktördür. Ülkemiz için hem tek sağlık yaklaşımına sahip bir eğitim modeli geliştirmek hem de farklı disiplinlerden profesyonelleri bir araya getirmek için pilot bir eğitim modeli geliştirilmiştir. Bu eğitim modelinden beklenen en önemli çıktı, ülke genelinde antibiyotik duyarlılık testlerinde farklı disiplinler arasında standardizasyonu sağlamak ve farklı sektörlerde aynı dili konuşabilmeyi sağlamaktır.

Tek sağlık yaklaşımında hastalıkları önleme ve kontrol altına almak için disiplinler arası, sektörler arası, bölgeler arası iletişim ve iş birliği kurulması önemlidir. Bu nedenle özellikle profesyonellerin eğitiminde bu tip modellere yer verilmesi onların meslek yaşantılarına da farklı bir bakış açısı kazandıracaktır<sup>(7)</sup>. Bizim projemizde de katılımcılardan alınan geri bildirimler doğrultusunda tek sağlık yaklaşımına sahip multidisipliner antibiyotik direnç eğitim modellerine gereksinim duyulduğu ortaya çıkmıştır. Bu tip eğitimlerin üniversite ve enstitü eğitim-öğretim programlarına eklenebilir ve uygulanabilir olduğu düşünülmektedir.

Antibiyotik direncinin yönetiminde antibiyotik direncine neden olabilecek tüm kaynaklarda kontrol önlemleri almak gerekmektedir. Bu nedenle tek sağlık yaklaşımında sürveyans sistemleri geliştirilmeli ve direnç verileri analiz edilmelidir. Çünkü antibiyotik direnci lokal, bölgesel ve hatta küresel bir epidemiyoloji sorunudur. Sürveyans sistemlerinden elde edilecek veriler, politik kararların bilimsel kanıtlara dayalı verilmesini sağlar. İnsan-hayvan-çevre entegre

sürveyansının kurulması, daha proaktif bir yaklaşım sergilemeyi de sağlayacaktır. Bilimsel bir veri oluşturacak bu sürveyans sistemlerinde veri kalitesi ve standardizasyon en önemli noktalar<sup>(8,9)</sup>. Bu nedenle farklı disiplinlerden profesyonellerin standardize veri üretmesi gerekmektedir. Bu eğitim programında da farklı disiplinler bir araya getirilerek ülke genelinde antibiyotik duyarlılık testlerinin tek sağlık yaklaşımında standardize uygulanmasına adım atılmıştır.

2015 yılında ilk kez ECDC, EFSA ve EMA iş birliği ile insan, gıda kaynaklı hayvanlarda etken olan bakteriler için ortak bir antibiyotik direnci raporu yayınlanmıştır<sup>(10)</sup>. Rapor, farklı sektörlerdeki antibiyotik direnci ve antibiyotik tüketim verilerini ortaya koyarak büyük pencereden antibiyotik direnç ilişkilerini ortaya koyan bir rapordur. Bu rapor, Avrupa birliğine üye ülkeleri içerecek şekilde bölgesel olarak hazırlanmıştır. Ülkemiz içinde bu tip raporların hazırlanmasına ihtiyaç vardır.

Üniversiteler artık tek sağlık yaklaşımında kendi ihtiyaçları doğrultusunda farklı eğitim modelleri geliştirmektedirler. Yüksek lisans, doktora ve post doktora öğrencilerine yönelik ya da lisans öğrencilerine yönelik multidisipliner eğitim programları oluşturmaktadır. Eğitim programları dışında üniversiteler, enstitüler, tek sağlık yaklaşımında multidisipliner ve intersektörel kurs ve çalıştaylar düzenlemektedirler<sup>(11)</sup>. Tek sağlık yaklaşımında eğitim programları daha çok veteriner sektöründe yer almakta olup, insan sektöründe tek sağlık yaklaşımında eğitim modellerine daha az rastlanmaktadır<sup>(12-14)</sup>. DSÖ, zoonotik hastalıklar ve antibiyotik direnci gibi konu başlıklarında uygulamaların hem multidisipliner hem de çok uluslu çalışmalar olması gerektiğini vurgulamaktadır ve bu hastalıklara karşı önleme stratejilerinin tek sağlık çerçevesinde ele alınması gerektiğini belirtmektedir<sup>(11)</sup>.

DSÖ'nün tavsiyeleri doğrultusunda, AMR ve bulaşıcı hastalık araştırmaları, araştırma ve eğitim için ayrı konular olmamalı, bunun yerine bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrolü için tek bir stratejinin parçası olmalıdır<sup>(13,14)</sup>. Ayrıca, zoonotik hastalıklar ve AMR ülke sınırlarında bitmediğinden, tek sağlık araştırma

ve eğitim girişimleri hem multidisipliner hem de çok uluslu olmalıdır. Finansman araçları, bu tür iş birliklerine rehberlik etmek için kullanılabilir.

Tek sağlığın önemi konusunda farkındalığın yüksek olmasına rağmen tek sağlık uygulamalarında farklı farklı sorunlar karşımıza çıkabilmektedir. Ülkelerde tek sağlık yaklaşımında araştırma ve eğitim modellerinin geliştirilmesi yönünde teşvikler sağlanmalıdır. Gereksinim analizleri yapılmalı ve ülkeler kendi güçlü yanlarını ön plana çıkararak ve geliştirilmesi gereken yönlerinin geliştirilmesini sağlayacak multidisipliner programlar geliştirmelidirler. Bu eğitim programının sürekliliği sağlanacak olup bir önceki eğitimden elde edilen tecrübeler ile eğitim programında modifikasyonlar yapılması planlanmaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde antibiyotik duyarlılık testlerinde kapasite geliştirilmesine yönelik bir gereksinim belirlenmiş ve bu ihtiyacın giderilmesi için eğitim programı geliştirilmiş ve program başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bu tip eğitim modellerinin yaygınlaştırılmasının antibiyotik direnci sürveyansında veri kalitesini arttıracak ve dolayısıyla antibiyotik direnci yönetimine olumlu katkı sağlayacağı kanısındayız.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

## KAYNAKLAR

1. Sun Q, Wang Y, Hulth A, et al. Study protocol for One Health data collections, analyses and intervention of the Sino-Swedish integrated multisectoral partnership for antibiotic resistance containment (IMPACT). *BMJ Open*. 2018;8(1):e017832. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017832>
2. WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance-Options for action 2012. World Health Organization. 2012.
3. Barton Behravesh C. Introduction. One Health: over a decade of progress on the road to sustainability. *Rev*

- Sci Tech. 2019;38(1):21-50.  
<https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2939>
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-8.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
  5. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014.
  6. WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization, 2015.
  7. Wilkes MS, Conrad PA, Winer JN. One health-one education: medical and veterinary inter professional training. *J Vet Med Educat.* 2019;46(1):14-20.  
<https://doi.org/10.3138/jvme.1116-171r>
  8. Linder D, Cardamone C, Cash SB, et al. Development, implementation, and evaluation of a novel multidisciplinary one health course for university undergraduates. *One Health.* 2020;9:100121.  
<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100121>
  9. Thakur S, Gray GC. The mandate for a global “One Health” approach to antimicrobial resistance surveillance. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100(2):227-8.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0973>
  10. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals, Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. [<http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-jiacra-report.pdf>] (Erişim tarihi: 12.Nisan.2021)
  11. Sikkema R, Koopmans M. One Health training and research activities in Western Europe. *Infec Ecol Epidemiol.* 2016;6:33703.  
<https://doi.org/10.3402/iee.v6.33703>
  12. Stephen C, Karesh WB. Is One Health delivering results? Introduction. *Rev Sci Tech.* 2014;33(2):375-92.  
<https://doi.org/10.20506/rst.33.2.2301>
  13. Rubin C, Dunham B, Sleeman J. Making One Health a reality-crossing bureaucratic boundaries. *Microbiol Spectr.* 2014;2(1):OH-0016-2012.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.OH-0016-2012>
  14. Gibbs EP. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. *Vet Rec.* 2014;174(4):85-91.  
<https://doi.org/10.1136/vr.g143>

# Bir Üniversite Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Enterobacterales* Takımı Üyelerinin Dağılımının ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının İncelenmesi

## *Distribution and Antimicrobial Susceptibilities of Members of Enterobacterales Isolated from Blood Cultures in a University Hospital*

Hasan Cenk Mirza\*<sup>✉</sup>, Banu Sancak\*\*<sup>✉</sup>

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

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

**Atf/Cite as:** Mirza HC, Sancak B. Bir üniversite hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen *enterobacterales* takımı üyelerinin dağılımının ve antimikrobiyal duyarlılıklarının incelenmesi, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):348-53.

### Öz

**Amaç:** *Enterobacterales* takımı içerisindeki bakteriler, insanlarda çok çeşitli hastalıklar oluşturabilmektedirler. Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacterales* takımı içerisindeki bakterilerin cins/tür dağılımının incelenmesi ve antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılmasıdır.

**Yöntem:** Temmuz 2014 ile Nisan 2018 tarihleri arasında kan kültürlerinde üreyen *Enterobacterales* takımı üyeleri, çalışmaya dâhil edilmiştir. Bakterilerin tanımlanması için MALDI-TOF MS yöntemi kullanılmıştır. İzolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması amacıyla otomatize sistem (2014 ile 2018 yılları arasındaki izolatlar için VITEK 2 Compact, 2018 yılı izolatları için BD Phoenix) ve disk difüzyon testi kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları EUCAST rehberindeki sınır değerlere göre değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Kan kültürlerinden toplam 1.765 adet *Enterobacterales* üyesi bakteri izole edilmiştir. Sırasıyla en sık *Escherichia coli* (%47.6), *Klebsiella* (%34.1), *Enterobacter* (%6), *Proteus* (%4.4) ve *Serratia* spp. (%3.5) izole edilmiştir. *Salmonella*, *Citrobacter*, *M. morganii*, *Pantoea*, *Raoultella* ve *Providencia* spp. kandan izole edilen diğer *Enterobacterales* üyeleri olmuştur. *E. coli*, *Klebsiella* ve *Enterobacter* spp. izolatlarında en düşük direnç oranının görüldüğü antibiyotikler meropenem ve amikasin olmuştur. Bununla birlikte, *Klebsiella* izolatlarında %21.1 oranında meropenem direnci gözlenmiştir. *Proteus* izolatlarına karşı en etkili antibiyotikler meropenem ve piperasilin-tazobaktam olmuş, bu antibiyotiklere karşı direnç gözlenmemiştir. *Serratia* izolatlarında en düşük direnç oranının görüldüğü antibiyotik trimetoprim-sülfametoksazol (%0) olmuştur. *Salmonella* izolatlarında %26.1 oranında siprofloksasin direnci saptanırken; trimetoprim-sülfametoksazol ile ampisiline karşı direnç saptanmamıştır. *Citrobacter* izolatlarında meropenem, amikasin ve gëfepime karşı direnç saptanmamıştır.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonuçlarının, *Enterobacterales* kaynaklı bakteriyemilerin tedavisinde uygulanacak antibiyotiklerin seçiminde yol gösterici olabileceği; ayrıca bakteriyemi etkeni *Enterobacterales* üyelerinin dağılımı konusundaki epidemiyolojik bilgi gereksinimini karşılayabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Enterobacterales*, epidemiyoloji, kan kültürü, antimikrobiyal duyarlılık testi, antibiyotik duyarlılık testi

### ABSTRACT

**Objective:** Members of *Enterobacterales* can cause various diseases in humans. The objective of this study was to determine the genus/species distribution and antimicrobial susceptibilities of *Enterobacterales* isolated from blood cultures in Central Laboratory of Hacettepe University Hospital.

**Method:** *Enterobacterales* isolated from blood between July-2014 and April-2018 were included in the study. MALDI-TOF MS was used for the identification of isolates. Antimicrobial susceptibilities were determined with automated system (VITEK 2 Compact for the isolates between 2014 and 2018; BD Phoenix for the isolates in 2018) and disk diffusion method. Results of antimicrobial susceptibility testing were interpreted according to EUCAST breakpoints.

**Results:** In total, 1765 isolates belonging to the order *Enterobacterales* were isolated from blood cultures. The most common microorganisms were *Escherichia coli* (47.6%), *Klebsiella* (34.1%), *Enterobacter* (6%), *Proteus* (4.4%) and *Serratia* spp. (3.5%), respectively. The remaining isolates included *Salmonella*, *Citrobacter*, *M. morganii*, *Pantoea*, *Raoultella* and *Providencia* spp. The lowest resistance rates among *E. coli*, *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. isolates were observed against meropenem and amikacin. However, 21.1% of *Klebsiella* isolates were resistant to meropenem. The most active antimicrobials against *Proteus* isolates were piperacillin-tazobactam and meropenem. Resistance was not observed against piperacillin-tazobactam and meropenem among *Proteus* isolates. The most active antimicrobial against *Serratia* isolates was trimethoprim/sulfamethoxazole with a resistance rate of 0%. Resistance was not noted against ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole among *Salmonella* isolates, whereas 26.1% of isolates were resistant to ciprofloxacin. All *Citrobacter* isolates were susceptible to meropenem, amikacin and cefepime.

**Conclusion:** Findings of our study may guide the selection of proper antimicrobials for the treatment of bacteremia caused by *Enterobacterales*. Furthermore, this study provides important epidemiological information regarding the distribution of members of *Enterobacterales* causing bacteremia.

**Keywords:** *Enterobacterales*, epidemiology, blood culture, antimicrobial susceptibility testing, antibiotic susceptibility testing

**Alındığı tarih / Received:**  
23.03.2021 / 23.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
14.06.2021 / 14.June.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

H.C. Mirza 0000-0002-8853-3893  
B. Sancak 0000-0002-0098-4674

✉ cenkmirza@baskent.edu.tr

© 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

*Enterobacteriaceae* ailesi, tıbbi öneme sahip birçok bakteri cinsi ve türünü barındırmaktadır. Bu aile içerisinde bulunan bakterilerin ortak özellikleri arasında Gram-negatif olmaları, spor oluşturmamaları, fakültatif anaerop olmaları, glukozu fermente etmeleri, nitratı nitrite indirgemeleri, katalaz testlerinin pozitif olması ve oksidaz testlerinin negatif olması (*Plesiomonas* hariç) sayılabilir<sup>(1)</sup>. Toprakta, suda, bitkilerde yaygın olarak bulunan bu bakteriler, ayrıca insanların ve birçok hayvanın bağırsak florasının önemli bir bölümünü oluşturur. *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri aynı zamanda insanlarda çok çeşitli hastalıklar oluşturabilmektedirler. Tüm bakteriyemilerin üçte birinden, üriner sistem enfeksiyonlarının %70'inden fazlasından ve birçok intestinal enfeksiyondan sorumludurlar<sup>(2)</sup>. Sonuçları 2016 yılında yayınlanan taksonomik bir çalışma sonrasında; daha önce *Enterobacteriaceae* ailesi içerisinde yer alan bazı cinsler, *Enterobacterales* takımı içerisinde oluşturulan başka aileler içerisine aktarılmıştır. Bu cinslere örnek olarak *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Pantoea* ve *Hafnia* verilebilir<sup>(3)</sup>.

Çalışmamızın amacı, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacterales* takımı içerisindeki bakterilerin cins/tür dağılımının incelenmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılmasıdır. Literatürde taksonomik değişikliklerden önce yayınlanan çalışmalarla da uyumu sağlamak amacıyla; çalışmamız, kan kültürlerinden izole edilen ve daha önce *Enterobacteriaceae* ailesi içerisinde yer alan cinsleri de kapsamaktadır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul'u tarafından (20.04.2021 tarih ve GO 21/547 kayıt numarası) onaylanmıştır.

Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na Temmuz 2014 ile Nisan 2018 tarihleri

arasında gönderilen kan kültürlerinde üreyen *Enterobacterales* takımı üyeleri çalışmamıza dâhil edilmiştir. Her hastadan tek izolat çalışmamıza alınmıştır.

Kan kültürlerinin inkübasyonu için 2014-2018 yılları arasında BacT/ALERT (bioMérieux, Fransa) kan kültürü sistemi, 2018 yılında ise BD BACTEC™ FX (BD, ABD) kan kültürü sistemi kullanılmıştır. Bakterilerin tanımlanması için MALDI-TOF MS yöntemi [2014 ile 2018 yılları arasındaki izolatlar için VITEK MS (bioMérieux, Fransa), 2018 yılı izolatları için Microflex LT (Bruker Daltonics, Almanya)] kullanılmıştır. İzolatların ampisilin (AMP), amoksisilin-klavulanik asit (AMC), piperasilin-tazobaktam (PTZ), seftazidim (CAZ), sefepim (FEP), meropenem (MEM), siprofloksasin (CIP), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), amikasin (AMK) ve gentamisin (GEN) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarının saptanması amacıyla otomatize sistem [2014 ile 2018 yılları arasındaki izolatlar için VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa), 2018 yılı izolatları için BD Phoenix (Sparks, ABD)] ve disk difüzyon testi kullanılmıştır. Meropeneme karşı direnç saptanması hâlinde, doğrulama amacıyla gradiyent difüzyon yöntemi (Etest, bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları EUCAST rehberindeki duyarlılık sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir<sup>(4)</sup>. Antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda "orta duyarlı" olarak bulunan izolatlar "dirençli" kabul edilmiştir. İzolat sayısı beş ve altında olan türler için, antibiyotiklere direnç oranı hesaplanmamıştır.

## BULGULAR

Çalışmamızın kapsadığı tarihler arasında kan kültürlerinden toplam 1.765 adet *Enterobacterales* üyesi bakteri izole edilmiştir. İzolatların %47.6'sını *Escherichia coli* oluştururken, %34.1'ini *Klebsiella* spp., %6'sını *Enterobacter* spp., %4.4'ünü *Proteus* spp., %3.5'ini *Serratia* spp., %1.3'ünü *Salmonella* spp., %1.1'ini *Citrobacter* spp. oluşturmuştur. *M. morgani*, *Pantoea* spp., *Raoultella* spp. ve *Providencia* spp. ise izolatların kalan %1.9'lük kısmını oluşturmuştur. İzolatların cins/tür dağılımı, sayıları ve antibiyotiklere direnç oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.



Tablo 1. Kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacterales* takımı üyelerinin dağılımı ve antibiyotik direnci [n(%)].

Mikroorganizma (n)	AMP	AMC	PTZ	CAZ	FEP	MEM	AMK	GEN	CIP	SXT
<i>Escherichia coli</i> (841)	644 (76.6)	494 (58.7)	218 (25.9)	328 (39)	342 (40.7)	13 (1.5)	78 (9.3)	202 (24)	486 (57.8)	451 (53.6)
<i>Klebsiella</i> spp. (602)	R	399 (66.3)	361 (60)	340 (56.5)	315 (52.3)	127 (21.1)	108 (17.9)	195 (32.4)	307 (51)	266 (44.2)
<i>K. pneumoniae</i> (513)	R	345 (67.3)	327 (63.7)	322 (62.8)	303 (59.1)	122 (23.8)	104 (20.3)	186 (36.3)	280 (54.6)	256 (49.9)
<i>K. oxytoca</i> (59)	R	24 (40.7)	22 (37.3)	5 (8.5)	9 (15.3)	3 (5.1)	3 (5.1)	6 (10.2)	20 (33.9)	8 (13.6)
<i>K. aerogenes</i> (30)	R	R	12 (40)	13 (43.3)	3 (10)	2 (6.7)	1 (3.3)	3 (10)	7 (23.3)	2 (6.7)
<i>Enterobacter cloacae</i> kompleksi (106)	R	R	*23 (38.3)	40 (37.7)	36 (34)	15 (14.2)	15 (14.2)	26 (24.5)	36 (34)	32 (30.2)
<i>Proteus</i> spp. (78)	37 (47.4)	17 (21.8)	0 (0)	5 (6.4)	7 (9)	0 (0)	4 (5.1)	17 (21.8)	42 (53.8)	42 (53.8)
<i>P. mirabilis</i> (71)	30 (42.3)	14 (19.7)	0 (0)	5 (7)	7 (9.9)	0 (0)	4 (5.6)	17 (23.9)	40 (56.3)	38 (53.5)
<i>P. vulgaris</i> (5)	R	2 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)	3 (-)
<i>P. penneri</i> (2)	R	1 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)	1 (-)
<i>Serratia</i> spp. (62)	61 (98.4)	60 (96.8)	15 (24.2)	8 (12.9)	4 (6.5)	9 (14.5)	5 (8.1)	5 (8.1)	15 (24.2)	0 (0)
<i>S. marcescens</i> (60)	R	R	15 (25)	8 (13.3)	4 (6.7)	9 (15)	5 (8.3)	5 (8.3)	15 (25)	0 (0)
<i>S. liquefaciens</i> (2)	1 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
<i>Salmonella</i> spp. (23)	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	6 (26.1)	0 (0)
<i>Citrobacter</i> spp. (20)	R	15 (75)	3 (15)	4 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	6 (30)	1 (5)
<i>C. freundii</i> (12)	R	R	2 (16.7)	2 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8.3)	4 (33.3)	1 (8.3)
<i>C. koseri</i> (3)	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0 (-)
<i>C. braaki</i> (3)	R	R	1 (-)	2 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0 (-)
<i>C. farmeri</i> (1)	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
<i>C. amolanaticus</i> (1)	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
<i>M. morgani</i> (16)	R	R	2 (12.5)	4 (25)	1 (6.3)	0 (0)	1 (6.3)	2 (12.5)	10 (62.5)	5 (31.3)
<i>Pantoea</i> spp. (8)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Raoultella</i> spp. (7)	R	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14.3)
<i>R. ornithinolytica</i> (4)	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
<i>R. planticola</i> (3)	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)
<i>Providencia</i> spp. (2)	R	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)	1 (-)	0 (-)
<i>P. rettgeri</i> (1)	R	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0 (-)
<i>P. stuartii</i> (1)	R	R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0 (-)	0 (-)

\* 60 izolatın piperasilin/tazobaktam duyarlılık sonucuna ulaşılabilmektedir.

R: Doğal dirençli

## TARTIŞMA

Kan kültürlerinde üreyen *Enterobacterales* üyelerinin cins/tür dağılımının ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmamızda sırasıyla en sık *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp, *Proteus* spp. ve *Serratia* spp. izole edilmiştir. Tüm *Enterobacterales* üyelerinin %87.8'ini *E. coli*, *Klebsiella* ve *Enterobacter* spp. oluşturmuştur. Daha önce yapılan çalışmaların çoğunda, kandan izole edilen *Enterobacterales* takımı üyeleri içerisinde ilk üç sıradaki cins/türün çalışmamızdaki gibi *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* spp. şeklinde olduğu görülmektedir<sup>(5-9)</sup>. Bununla birlikte, bu sıralamanın değiştiği bazı çalışmalara da rastla-

mak olasıdır. İzmir'de yapılan bir çalışmada, kan kültürlerinde üreyen *Enterobacterales* üyeleri içerisinde sırasıyla en sık *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* ve *Serratia marcescens* izole edilmiştir<sup>(10)</sup>. Şirin ve ark.<sup>(11)</sup> tarafından yürütülen başka bir çalışmada da *S. marcescens*; *E. coli* ve *K. pneumoniae*'dan sonra en sık izole edilen *Enterobacterales* üyesi olmuştur.

Çalışmamızdaki *E. coli* izolatlarında direncin en düşük görüldüğü antibiyotikler meropenem (%1.5) ve amikasin (%9.3); en yüksek görüldüğü antibiyotik ise ampisilin (%76.6) olmuştur. Bu sonuçlar ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumludur<sup>(7, 9-11)</sup>.

Çalışmamızda, *Klebsiella* spp. izolatlarının direnç oranının en düşük olduğu antibiyotik amikasin (%17.9) olmuştur. *Klebsiella* spp. izolatlarının %21.1'inde ise meropenem direnci gözlenmiştir. Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda, kandan izole edilen *Klebsiella* spp. arasında meropenem direnci %0 ile %44.4 arasında bildirilmiştir<sup>(7, 9-11)</sup>. Çalışmamızda, *Klebsiella* cinsi içerisinde amoksisilin-klavulanik asit haricinde tüm antibiyotiklere karşı en yüksek direnç oranının görüldüğü tür, *K. pneumoniae* olmuştur. *Klebsiella aerogenes* amoksisilin-klavulanik asite doğal dirençli olduğu için, bu antibiyotiğe karşı direnç oranının en yüksek olduğu (%100) tür olarak kabul edilmiştir.

Amikasin ve meropenem, çalışmamızdaki *Enterobacter* spp. izolatlarına karşı da en etkili antibiyotikler olarak saptanmış, her iki antibiyotiğe de %14.2 oranında direnç gözlenmiştir. Atik ve ark.<sup>(7)</sup> tarafından yönetilen çalışmada da amikasin, kandan izole edilen *Enterobacter* spp. suşlarına karşı en yüksek etkinlik gösteren antibiyotik olarak saptanmış, amikasin direnç oranı %2.5 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmamızdaki *Enterobacter* spp. izolatlarındaki antibiyotik direnç oranlarının, Atik ve ark.<sup>(7)</sup> tarafından yönetilen çalışmaya kıyasla daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

Çalışmamızda izole edilen *Proteus* spp. izolatlarında direnç oranının en yüksek olduğu (%53.8) antibiyotikler siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazol olarak saptanmıştır. Siprofloksasin direncinin ülkemizde yapılan diğer çalışmalardan<sup>(7,11)</sup> yüksek olduğu, trimetoprim-sülfametoksazol direncinin ise Şirin ve ark.<sup>(11)</sup> tarafından yönetilen çalışmayla uyumlu olduğu görülmüştür. *Proteus* cinsi içerisinde en sık *Proteus mirabilis* izole edilmiş; ayrıca beş adet *Proteus vulgaris* ve iki adet *Proteus penneri* izole edilmiştir. *P. mirabilis*'in doğal dirençli olduğu antibiyotiklere ek olarak *P. vulgaris* ve *P. penneri*'nin ampisilin, sefazolin, sefalotin ve sefuroksime de doğal dirençli olduğu bilinmektedir<sup>(12)</sup>.

*Serratia marcescens* çalışmamızda kandan izole edilen *Enterobacterales* üyelerinin %3.4'ünü oluşturmuştur. Çalışmamızdaki *S. marcescens* izolatlarında meropenem direnci (%15), geniş spektrumlu sefalos-

porin (seftazidim, sefepim) direncinden daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni, şu ana kadar sadece *S. marcescens*'de tanımlanmış olan SME karbapenemazlar olabilir. SME enzimlerinin geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterdiği bilinmektedir<sup>(13)</sup>. Çalışmamızdaki *S. marcescens* izolatlarında en düşük direnç oranının görüldüğü antibiyotik trimetoprim-sülfametoksazol (%0) olmuştur.

*Salmonella*'nın, Sahra Altı Afrika ülkelerinde görülen kan dolaşımı enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olduğu bilinmektedir. Afrika'da 6 ülkenin katılımıyla yapılan çalışmada, bakteri üremesi saptanan kan kültürlerinin %47.1'inden *Salmonella* spp. izole edilmiştir<sup>(14)</sup>. Çin'de ise 19 hastanenin katılımıyla yapılan ve kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinin araştırıldığı bir çalışmada *E. coli* ve *Klebsiella*'dan sonra en sık *Salmonella* spp. izole edilmiş; izolatların %10.4'ünü oluşturmuştur<sup>(15)</sup>. Çalışmamızda, *Salmonella* spp., izolatların %1.3'ünü oluşturmuştur. Bununla birlikte, çalışmamızdaki *Salmonella* izolatlarında önemli oranda (%26.1) siprofloksasin direnci saptanmıştır.

*Citrobacter* spp., çalışmamızda kandan izole edilen *Enterobacterales* takımı üyelerinin %1.1'ini oluşturmuştur. Dünyanın farklı yerlerinde ve ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında, bu oranın %0 ile %4.1 arasında değiştiği görülmektedir<sup>(6,7,9,11,15-17)</sup>. Çalışmamızda, kandan izole edilen *Citrobacter* izolatlarının %60'ını *Citrobacter freundii* oluşturmuştur. *Citrobacter koseri*, *Citrobacter braaki*, *Citrobacter farmeri* ve *Citrobacter amalonaticus*, kandan izole edilen diğer türlerdir. Çalışmamızdaki *Citrobacter* spp. izolatlarında meropenem, amikasin ve sefepime karşı direnç saptanmamıştır. Bununla birlikte, izole edilen suşlar arasında özellikle *C. freundii* ve *C. braaki*'nin doğal dirençli olduğu antibiyotik sayısının fazla olması, bu türlerin önemini artırmaktadır<sup>(18)</sup>.

Yurt dışında ve ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda, *Morganella morganii* izolatlarının kandan izole edilen *Enterobacterales* içerisindeki oranı %0 ile %1.9 arasında saptanmıştır<sup>(6,7,11,15,17)</sup>. Çalışmamızda bu oran %0.9 olarak bulunmuştur. Meropenem, çalışmamızdaki *M. morganii* izolatlarına karşı en etkili antibiyotik ola-

rak saptanmış; direnç oranının en yüksek olduğu (%62.5) antibiyotik ise siprofloksasin olmuştur.

*Pantoea*, *Raoultella*, *Providencia* spp. izolatlarının toplamı, çalışmamızdaki *Enterobacterales* izolatlarının %1'ini oluşturmuştur. *Pantoea* spp. izolatlarında ampisilin haricinde antibiyotik direnci gözlenmemiştir. Toplamda yedi adet *Raoultella* spp. izole edilmiş, bunlardan dördü *Raoultella ornithinolytica*, üçü ise *Raoultella planticola* olarak tanımlanmıştır. Bu iki tür, *Raoultella* cinsi içerisinde en sık karşılaşılan türlerdir. *Raoultella* spp. izolatlarının genellikle antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinmektedir<sup>(19)</sup>. Trimetoprim-sülfametoksazol ile doğal dirençli olduğu ampisilin haricinde, *Raoultella* spp. izolatlarında çalışmamızdaki antibiyotiklere karşı direnç saptanmamıştır. Kandan izole edilen *Enterobacterales* üyeleri içerisinde en düşük orana sahip (%0.1) bakteri cinsi *Providencia* olmuştur. Çalışmamızda bir *Providencia rettgeri* ve bir *Providencia stuartii* olmak üzere iki adet *Providencia* spp. izole edilmiştir.

Her ne kadar antibiyotik duyarlılık testleri için altın standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi olsa da, klinik örnek yükünün yüksek olduğu hastanelerde sonuçlar otomatize cihazlar kullanılarak verilmektedir. Çalışmamızın kapsadığı tarihler arasında, izolatların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması için iki farklı otomatize cihaz kullanılması, çalışmamızın kısıtlılığı olarak değerlendirilebilir. Yapılan çalışmalarda *Enterobacteriaceae* için genellikle sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile otomatize sistem sonucu uyumu yüksek olsa da otomatize sistem sonuçlarının yakından takibi önemlidir. Klinik örneklerden izole edilen enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların dağılımının ve antibiyotik duyarlılıklarının her merkez tarafından takip edilmesi, antibiyotik tedavisinin yönlendirilmesi açısından<sup>(7)</sup> ve epidemiyolojik açıdan önemlidir. Kan dolaşımı enfeksiyonları önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında olup<sup>(20)</sup>, *Enterobacterales* takımı üyeleri bakteriyemilerin önemli bir kısmından sorumludur<sup>(21, 22)</sup>. Çalışmamızın sonuçlarının, *Enterobacterales* kaynaklı bakteriyemilerin tedavisinde uygulanacak antibiyotiklerin seçiminde yol gösterici olabileceği; ayrıca bakteriyemi etkeni *Enterobacterales* üyelerinin dağılımı konusundaki epidemiyolojik bilgi ihtiyacını karşılaya-

bileceği düşünülmektedir.

**Etik Kurulu Onayı:** Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul'u tarafından (20.04.2021 tarih ve GO 21/547 kayıt numarası) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Hacettepe University Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee (04.20.2021; GO 21/547).

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

## KAYNAKLAR

1. Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ (Eds.). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious diseases. Philadelphia (PA): Elsevier/Saunders, 2015:2503-17.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Philadelphia: Elsevier, 2013.
3. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacterales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5575-99. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
4. EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 11.0 [http://www.eucast.org/clinical\_breakpoints]. (Erişim tarihi: 10/03/2021).
5. Pien BC, Sundaram P, Raoof N, et al. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. Am J Med. 2010;123(9):819-28. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.03.021>
6. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in blood cultures. Emerg Infect Dis. 2015;21(3):504-7. <https://doi.org/10.3201/eid2103.141277>
7. Kula Atik T, Uzun B. Kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. ANKEM Derg. 2020;34(2):33-40. <https://doi.org/10.5222/ankem.2020.033>
8. Kaya S, Arıdoğan BC, Çetin H, Demirci M. Çocuk

- hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik dirençleri. Fırat Tıp Dergisi. 2007;12(1):34-6.
9. Akyıldız Ö, Beşli Y, Kocagöz AS. Yoğun bakım ünitesinde bakteriyemi tanısı ile takip edilen hastaların değerlendirilmesi. Cukurova Med J. 2019;44(Suppl 1):521-8.  
<https://doi.org/10.17826/cumj.623795>
  10. Ece G. Kan kültüründe üreyen izolatların dağılımı ve antibiyotik duyarlılık profilinin incelenmesi. Haseki Tıp Bülteni. 2013;51(4):151-6.  
<https://doi.org/10.4274/Haseki.1044>
  11. Şirin MC, Ağuş N, Yılmaz N ve ark. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. Türk Hij Den Biyol Derg. 2017;74(4):269-78.  
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2017.94899>
  12. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
  13. Hemarajata P, Amick T, Yang S, et al. Selection of hyperproduction of AmpC and SME-1 in a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolate during antibiotic therapy. J Antimicrob Chemother. 2018;73(5):1256-62.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dky028>
  14. Al-Emran HM, Eibach D, Krumkamp R, et al. A multicountry molecular analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhi with reduced susceptibility to ciprofloxacin in sub-Saharan Africa. Clin Infect Dis. 2016;62(Suppl 1): S42-6.  
<https://doi.org/10.1093/cid/civ788>
  15. Liu XJ, Lyu Y, Li Y, Xue F, Liu J. Trends in antimicrobial resistance against *Enterobacteriaceae* strains isolated from blood: A 10-year epidemiological study in Mainland China (2004-2014). Chin Med J (Engl). 2017;130(17):2050-55.  
<https://doi.org/10.4103/0366-6999.213407>
  16. Kajumbula H, Fujita AW, Mbabazi O, et al. Antimicrobial drug resistance in blood culture isolates at a tertiary hospital, Uganda. Emerg Infect Dis. 2018;24(1):174-5.  
<https://doi.org/10.3201/eid2401.171112>
  17. Çiçek A, Kuzucu Ç, Durmaz R, Yoloğlu S. Bir yıllık sürede kan kültürlerinin klinik, epidemiyolojik ve bakteriyolojik yönden prospektif analizi. Flora. 2006;11(1):37-44.
  18. EUCAST. Expert rules and intrinsic resistance. EUCAST advice on intrinsic resistance and exceptional phenotypes v3.2 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [[http://www.eucast.org/expert\\_rules\\_and\\_intrinsic\\_resistance/](http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/)] (Erişim tarihi: 17/03/2021).
  19. Sękowska A. *Raoultella* spp.-clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. Folia Microbiol (Praha). 2017;62(3):221-7.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-016-0490-7>
  20. López-Pintor JM, Navarro-San Francisco C, Sánchez-López J, et al. Direct antimicrobial susceptibility testing from the blood culture pellet obtained for MALDI-TOF identification of *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(6):1095-104.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-019-03498-y>
  21. Buetti N, Atkinson A, Marschall J, et al. Incidence of bloodstream infections: a nationwide surveillance of acute care hospitals in Switzerland 2008-2014. BMJ Open 2017;7(3): e013665.  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-013665>
  22. Durand C, Boudet A, Lavigne JP, Pantel A. Evaluation of two methods for the detection of third generation cephalosporins resistant *Enterobacterales* directly from positive blood cultures. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:491.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00491>

# ***Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis*'in Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı: Optimizasyon Çalışması**

## *Diagnosis of Blastocystis sp., Cryptosporidium sp., and Giardia intestinalis by Multiplex PCR: An Optimization Study*

Ali Ahmet Kilimcioğlu\*<sup>1</sup>, Nogay Girginkardeşler\*<sup>1</sup>, Tuba Oyur\*<sup>1</sup>, Selin Bölük Sabuncu\*<sup>1</sup>,  
Didem Düzyol Azak\*<sup>1</sup>, Serhan Görgün\*\*<sup>1</sup>, Işın Akyar\*\*\*<sup>1</sup>, Özgür Kurt\*\*\*<sup>1</sup>, Tanıl Kocagöz\*\*\*<sup>1</sup>  
Ahmet Özbilgin\*<sup>1</sup>

\* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

\*\* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa, Türkiye

\*\*\* Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Atf/Cite as:** Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Oyur T ve ark. *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis*'in multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı: Optimizasyon çalışması, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):354-62.

### Öz

**Amaç:** Özellikle immun sistemi baskılanmış hastalar ve çocuklarda şiddetli gastrointestinal sistem yakınmalarına yol açabilen *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis*'in tanısı için yerli hastalardan elde edilen izolatlarla yeni bir Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Mikroskopik incelemesinde yoğun miktarlarda *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* ve *Giardia intestinalis* saptanan farklı hastalara ait üç dışkı örneğinden ticari bir kit ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Önce her bir protozoona karşı özel PZR protokolü geliştirilmiştir. Sonrasında bu üç protozoonun birlikte tanı konabildiği multipleks PZR protokolü optimize edilmiştir.

**Bulgular:** DNA izolasyonu sonrası gerçekleştirilen multipleks PZR protokolünde *Cryptosporidium sp.*, *Blastocystis sp.* ve *G. intestinalis* için sırasıyla 95 bp, 227 bp ve 258 bp'lik bantlar elde edilmiştir.

**Sonuç:** Geliştirilen özgün protokolle *Cryptosporidium sp.*, *Blastocystis sp.* ve *G. intestinalis*'in multipleks PZR ile tanısı gerçekleştirilmiştir. Parazitolojik incelemelerde farklı yöntemlerin kullanılmasındaki zorluklar nedeniyle, optimize edilen bu protokole halk sağlığı için önemli olan diğer protozoonların da eklenmesiyle, çok sayıda parazitin tek bir moleküler yöntemle saptanması mümkün hale gelebilecektir.

**Alındığı tarih / Received:**  
12.03.2021 / 12.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
22.06.2021 / 22.June.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

A.A. Kilimcioğlu 0000-0002-5736-7319  
N. Girginkardeşler 0000-0002-9680-4294  
T. Oyur 0000-0001-8014-284X  
S. Bölük Sabuncu 0000-0003-4701-287X  
D. Düzyol Azak 0000-0003-1236-3741  
S. Görgün 0000-0002-6150-7353  
I. Akyar 0000-0003-1115-0429  
Ö. Kurt 0000-0001-5575-588X  
T. Kocagöz 0000-0001-7211-2026  
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ alikilimcioglu@gmail.com

**Anahtar kelimeler:** Multipleks PZR, *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia intestinalis*, tanı

### ABSTRACT

**Objective:** It was aimed to develop a new Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) protocol with isolates obtained from local patients for the diagnosis of *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* and *Giardia intestinalis*, which can cause severe gastrointestinal system complaints especially in immunocompromised patients and children.

**Method:** DNA isolation was performed with a commercial kit from three stool samples of different patients whose microscopic examination showed dense amounts of *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* and *Giardia intestinalis*. First, a special PCR protocol has been developed for each protozoon. Then, the multiplex PCR protocol, in which these three protozoa can be diagnosed together, was optimized.

**Results:** In the multiplex PCR protocol performed after DNA isolation, bands of 95 bp., 227 bp. and 258 bp. were obtained for *Cryptosporidium sp.*, *Blastocystis sp.* and *G. intestinalis*, respectively.

**Conclusion:** *Blastocystis sp.*, *Cryptosporidium sp.* and *Giardia intestinalis* were diagnosed by multiplex PCR with the original protocol developed. Due to the difficulties in using different methods in parasitological examination, by adding other protozoa important for public health to this optimized protocol, it will be possible to detect a large number of parasites with a single molecular method.

**Keywords:** Multiplex PCR, *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia intestinalis*, diagnosis

## GİRİŞ

Bağırsak parazitlerine bağlı enfeksiyonlar dünyanın özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerinde her yıl çok sayıda insanın hastalanmasına veya ölüme neden olabilen, erişkinlerde işgücü kaybına, çocuklarda ise büyüme gelişme geriliğine yol açabilen önemli bir halk sağlığı sorunudur<sup>(1,2)</sup>. Gelişmekte olan ülkelerde her iki-üç kişiden birinde bağırsak paraziti olduğu tahmin edilirken, ülkemizde yapılan çalışmalarda bağırsak paraziti görülme sıklığının %2.2 ile %34.1 arasında değiştiği, Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da bu oranın diğer bölgelerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>(3-6)</sup>. Bağırsak parazitlerinin yol açtığı enfeksiyonlar sıklıkla ishal, kabızlık, karın ağrısı, bulantı, kusma, kaşıntı gibi belirtilerle kendini gösterirken, bazen de belirtisiz seyredebilir. Çocuklar içinse bağırsak parazitlerinin yol açtığı enfeksiyon uzun vadede daha ağır sorunlara yol açabilmekte, çocuklarda büyüme-gelişme geriliği, sık hastalanma tablosu ve okulda öğrenme güçlüğü görülebilmektedir<sup>(7,8)</sup>. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda parazitlere bağlı oluşan ishal bazen hayatı tehdit edecek kadar ciddi olabilmektedir<sup>(9,10)</sup>.

Bağırsak parazitlerine neden olan enfeksiyonların tanısında mikroskopik inceleme düşük duyarlılığına rağmen halen en yaygın kullanılan yöntemdir<sup>(11-14)</sup>. Laboratuvara taze ya da fiksatif solüsyon (%10 formol, sodyum asetat-asetik asit-formaldehit [SAF] fiksatif, vb.) içinde teslim edilen dışkı örneğinin önce %0.9'luk serum fizyolojik ve Lugol ile, daha sonra yoğunlaştırılıp Lugol solüsyonu ile ve kalıcı boya preparatları (trikrom, demir hematoksilen, Kinyoun asid-fast, vb.) ile hazırlanan yaymaların incelenmesi ideal mikroskopik inceleme yöntemleridir. Tüm bu işlemlerin en az üç ayrı gün alınacak dışkı örnekleriyle tekrarlanmasıyla dışkıda var olan parazitlerin saptanma olasılıklarının çok yüksek olacağı ifade edilmektedir<sup>(12-14)</sup>.

Son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerle parazitolojik hastalıkların tanısı tüm dünyada yaygınlaşan bir uygulamadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yüksek özgünlük ve duyarlılık değerleriyle bazı bağırsak

parazitlerinin tanısı için altın standart sayılmaktadır<sup>(15,16)</sup>. PZR yöntemi araştırılan enfeksiyon etkeninin tanısına yönelik özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek olduğu için mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarlarında, özellikle mikroskopla inceleme veya kültür ile kolayca saptanamayan enfeksiyon etkenlerinin tanısı için son derece yararlıdır. Bununla birlikte, PZR'nin de bazı dezavantajları vardır; bunların başında diğer tanı seçeneklerine göre daha pahalı olması, özel bir laboratuvar, ekipman ve eğitilmiş personel gerektirmesi sayılabilir. Aynı zamanda, araştırılan patojene uygun test koşullarının oluşturulma süreci olarak tanımlanan optimizasyonun bazen uzun zaman alması, test koşullarındaki ufak sapmalar ya da kontaminasyonların testin çalışmasını engellemesi de dezavantaj sayılmaktadır<sup>(17,18)</sup>.

PZR'nin farklı uygulamaları arasında yer alan gerçek zamanlı (real time) PZR ve multipleks (çoklu) PZR günümüzde parazitolojik enfeksiyonların rutin tanısında gitgide daha sık kullanılmaktadır<sup>(19,20)</sup>. İki veya daha çok mikroorganizmaya ait PZR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesine dayanan multipleks PZR yöntemi, optimizasyonu daha da güç olabileceği de son yıllarda paraziter hastalıklar için daha sık kullanılmakta olup bu yönde geliştirilmiş ticari test kitleri ve bunlarla yapılan araştırmalar bulunmaktadır<sup>(20-22)</sup>. Ülkemizden elde edilecek parazit örnekleriyle yapılacak çalışmalar sonucunda geliştirilecek multipleks PZR protokolünün duyarlı, özgün ve daha düşük maliyetli olacağı için rutin tanıda kullanılabileceği ve konvansiyonel yöntemlere göre fark yaratabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında mikroskopik inceleme ile *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* sp. ve *Giardia intestinalis* içerdiği saptanan üç farklı dışkı örneği kullanılarak özgün multipleks PZR protokolünün optimizasyonu amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

TIP 2010-121 nolu bu proje Manisa Celal Bayar

Tablo 1. *Cryptosporidium* sp. PZR protokolünün içeriği.

	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PZR Tamponu	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP karışımı	20 mM	0.2 mM
İleri Primer (FP)	20 µM	0.2 µM
Geri Primer (RP)	20 µM	0.2 µM
"Hot Start Taq polimeraz"	5 U/µl	2 U/µl
DNA		2 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş, Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 18.08.2011 tarih 275 sayılı izin alınmıştır. Ayrıca Manisa Celal Bayar Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'nin 12.06.2013 tarih 7661 sayılı yazısı ile proje başlığı değiştirilmesi talebi uygun görülmüştür. Araştırmamızda önce bağırsak parazitleri saptanmış, sonrasında DNA izolasyonu ve PZR yöntemi optimizasyonu aşamaları gerçekleştirilmiştir.

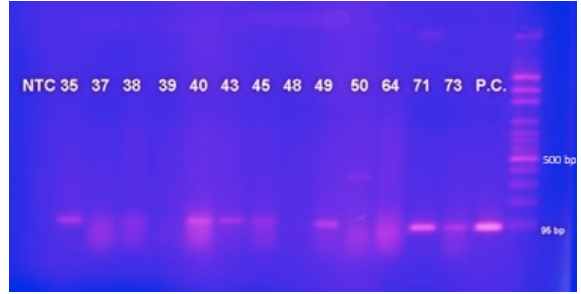
**Bağırsak Parazitlerinin Saptanması:** Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji A.D. laboratuvarlarında uygulanan direkt baki (serum fizyolojik ve Lugol solüsyonları ile inceleme), yoğunlaştırma ve trikrom boyama yöntemleri ile *Blastocystis* sp. ve *G. intestinalis* içerdiği saptanan iki dışkı örneği ile bunlara ek olarak Kinyoun asit-fast yöntemiyle boyanan ve *Cryptosporidium* sp. içerdiği saptanan bir olmak üzere toplam üç dışkı örneği proje kapsamında kullanılmıştır. Dışkı örnekleri çalışmaların yapılacağı tarihe kadar -20°C'de saklanmıştır.

**DNA İzolasyonu:** Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu ticari kit ("QIAamp DNA Stool Mini Kit", Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanmıştır.

**PZR Yöntemlerinin Optimizasyonu:** Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD'nin işbirliğiyle özgün bir multipleks PZR yöntemi geliştirilebilmesi amacıyla öncelikle her bir parazite ait ayrı ayrı PZR protokolleri oluşturulmuş, sonrasında ikili ve üçlü PZR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. *Cryptosporidium* sp. için optimize edilen test koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	15 dk	1
95	30 sn	40
58	30 sn	
72	30 sn	
72	7 dk	1

Resim 1. *Cryptosporidium* sp.'nin UV ışığında jel görüntüsü.

***Cryptosporidium* sp. için PZR yönteminin optimizasyonu:** *Cryptosporidium* cinsine özgün bir gen bölgesi BLAST analizleri ve Gen bankası verileri kullanılarak araştırılmış ve "*Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP)" geninin (Acce. no. HQ332161.1) korunmuş ve özgün bir bölgesi belirlenmiştir. Buna uygun olarak "Primer3" programıyla uygun primerler tasarlanmıştır. Daha sonra ise COWP geninin 95 baz çiftlik (bp) bir bölgesi çoğaltılmıştır<sup>(23)</sup> (Tablo 1, 2). *Cryptosporidium* sp. için PZR ile çoğaltılan ürünler elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Bunun için %1.8'lik agaroz jele aktarılan PZR ürünleri 100 volt akımda toplam 100 dakika yürütülmüş ve sonrasında etidyum bromid ile boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 1).

***Giardia* sp. için PZR yönteminin optimizasyonu:** *Giardia* sp.'nin PZR ile saptanabilmesi için önceki bir çalışmamızda geliştirdiğimiz primerler ile protokol kullanılmıştır<sup>(24)</sup>. Sert kist duvarı nedeniyle *G. intestinalis* örneklerinin DNA izolasyonunda zorluk çıkabildiğinden, izolasyon öncesi dışkı örnekleri kistlerin parçalanması amacıyla Roche MagnaLyser® ile muamele edilmiştir. Bu amaçla, içinde 1.4 mm çapında seramik boncuk bulunan (MagnaLyser® Green Beads) 2 ml'lik özel plastik tüplere 500 µl tamponlu bir tuz çözeltisi olan soğutulmuş 1 M fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenmiştir. Daha sonra bu çözeltinin üzerine de yak-

laşık 1.5 mg dışkı örneği eklenmiş ve karışım vorteks yardımıyla yüksek hızda 30 sn kadar karıştırılmıştır. Son aşamada örnekler MagnaLyser® cihazında 6500 devirde 1 dk karıştırma işlemi uygulanmış ve işlem sonunda tüp içerisindeki süspansiyondan 200 µl alınıp 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konulmuştur. DNA izolasyon işlemi bu aşamadan itibaren Qiagen® dışkı izolasyon kitiyle (QIAmp DNA Stool Mini Kit, Cat. No. 51504) kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen izolatlar PZR işlemi yapıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

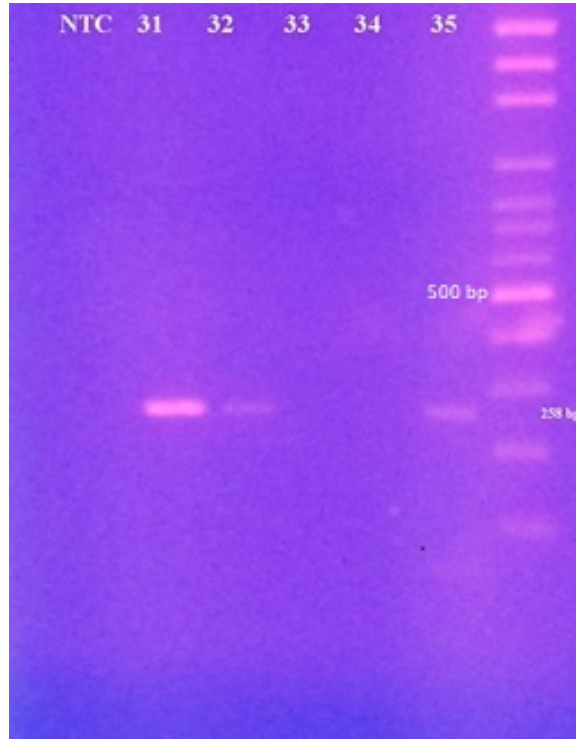
PZR için; *G. intestinalis* *tpi* geninin çoğaltılması için "Forward" 5'-TGGACTGGCGAGACAAG-3' ve "Reverse" 5'-TCCGGCTTGAGGGAAGC-3' primer seti kullanılmıştır. Reaksiyonun son konsantrasyonları ve ısı döngü cihazı programı Tablo 3 ve 4'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır<sup>(25)</sup>. *Giardia* sp. için PZR ile çoğaltılmış olan ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülmüş, etidyum bromid ile boyandıktan sonra oluşmuş spesifik bantlar UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 2).

**Blastocystis sp. için PZR yönteminin optimizasyonu:** *Blastocystis*'e ait özgün bir gen bölgesi BLAST analizleri ve Gen bankası verileri kullanılarak araştırılmış ve "*Blastocystis* sp. small subunit (SSU) ribosomal RNA" (Acce. no. JN587548.1) üzerinde korunmuş özgün bir gen bölgesi belirlenmiştir. Daha sonra Primer3 programı kullanılarak hazırlanan primerler ile (BLF: 5'-CGAATGGCTCATTATATCAGTT-3' ve BLR: 5'-TCTTCGTTACCGTTACTGC-3') rRNA geninin küçük alt ünitesinden (SSU) 227 bp'lik bir bölge çoğaltılmıştır<sup>(26)</sup> (Tablo 5, 6). PZR ile çoğaltılan ürünler daha sonra elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Bunun için 1xTBE tampon ile hazırlanan %1.5'lik agaroz jele aktarılan PZR ürünleri 100 volt akımda toplam 90

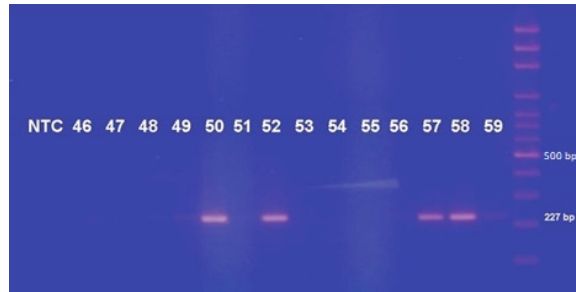
**Tablo 3. *Giardia intestinalis* PZR protokolünün içeriği.**

Reaksiyon Konsantrasyonu	
PZR Tamponu (10X)	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM
dNTP karışımı	100 mM
İleri Primer (FP)	1 µl
Geri Primer (RP)	1 µl
"Hot Start Taq polimeraz"	2.5 U/µl
DNA	3 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 50 µl'ye tamamlanmıştır.



**Resim 2. *Giardia intestinalis*'in UV ışığında jel görüntüsü.**



**Resim 3. *Blastocystis* sp.'nin UV ışığındaki jel görüntüsü.**

dakika yürütülmüş ve sonrasında etidyum bromid ile boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 3).

**Cryptosporidium sp. ve *G. intestinalis*'in ikili PZR optimizasyonu:** Sonraki aşamada *Cryptosporidium* sp. ile

**Tablo 4. *Giardia intestinalis* için optimize edilen test koşulları.**

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	3 dk	1
95	15 sn	35
58	30 sn	
72	30 sn	
72	3 dk	1

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 50 µl'ye tamamlanmıştır.



Tablo 5. *Blastocystis* sp. PZR protokolünün içeriği.

	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PZR Tamponu	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP karışımı	20 µM	0.2 µM
İleri Primer (FP)	20 µM	0.2 µM
Geri Primer (RP)	20 µM	0.2 µM
“Hot Start Taq polimeraz”	5 U/µl	3 U/µl
DNA		2 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Tablo 7. Üçlü PZR için protokol içeriği.

	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PZR Tamponu	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
dNTP mix	20 mM	0.2 mM
Blastocystis Forward	20 µM	0.2 µM
Blastocystis Reverse	20 µM	0.2 µM
<i>Cryptosporidium</i> sp. Forward	20 µM	0.8 µM
<i>Cryptosporidium</i> sp. Reverse	20 µM	1 µM
<i>Giardia</i> Forward	20 µM	0.6 µM
<i>Giardia</i> Reverse	20 µM	0.8 µM
Hot Start Taq polymerase	5 U/µl	2 U/µl
DNA		2 µl

PZR'ye uygun su (PZR-grade H<sub>2</sub>O) ile karışım 25 µl'ye tamamlanmıştır.

*Giardia* sp.'nin ikili PZR ile çoğaltılabilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. *Giardia* sp. tek başına çoğaltıldığında 258 bp'lik bir bant edilmiş, ancak *Cryptosporidium* sp. ile birlikte çoğaltıldığında aynı sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine *Giardia* sp. tpi gen bölgesi üzerinden başka bir baz dizisi primer olarak kullanılmış ve *Giardia* sp. için 113 bp'lik bir bant elde edildiği tespit edilmiştir.

*Cryptosporidium* sp., *G. intestinalis* ve *Blastocystis* sp.'nin üçlü PZR optimizasyonu: Projenin son aşamasında ise, geliştirilmiş olan ikili PZR protokolüne *Blastocystis* sp.'nin eklenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonunda, Tablo 7'de gösterilen test koşullarında üçlü PZR'nin optimize olduğu ve üç protozoona ait DNA'ların bir arada başarıyla çoğaltılabildiği saptanmıştır (Tablo 7, 8). PZR ile çoğaltılan ürünler elektroforez ile ayrıştırılmış, 1xTBE tampon ile hazırlanan %1.5'lik agaroz jele aktarılan PZR ürünleri 100 volt akımda toplam 90 dakika yürütülmüş ve sonrasında etidyum bromid ile boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir.

Tablo 6. *Blastocystis* sp. için optimize edilen test koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	5 dk.	1
95	30 s	40
58	30 s	
72	45 s	
72	5 dk.	1

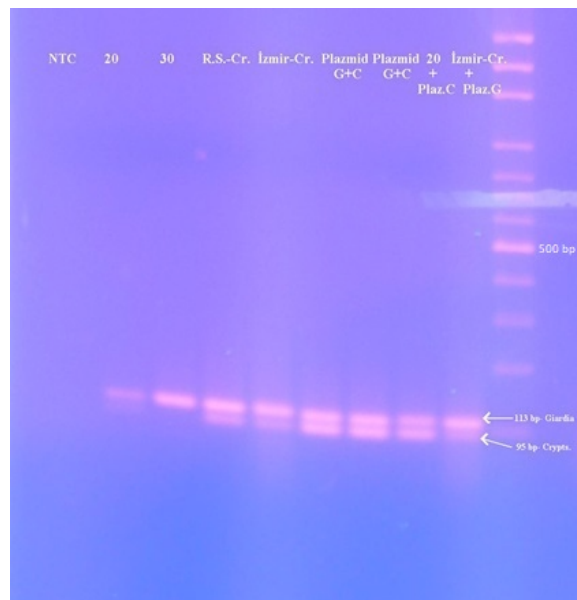
Tablo 8. Üçlü PZR için optimize edilen test koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	15 dk.	1
95	30 s	40
58	30 s	
72	45 s	
72	7 dk.	1

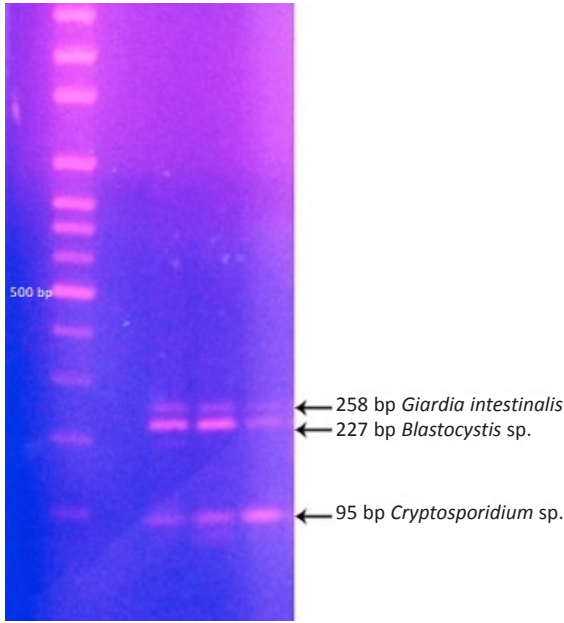
## BULGULAR

*Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp. ve *G. intestinalis* için sırasıyla 95, 227 ve 258 bp'lik bantlar elde edilmiş, agaroz jele aktarılan PZR ürünleri UV ışığında görüntülenmiştir (Resim 1,2,3).

*Cryptosporidium* sp. ve *G. intestinalis*'in ikili PZR ürünleri görüntülediğinde aynı jelde sırasıyla 95 ve 113 bp'lik bantlar elde edilmiştir (Resim 4).



Resim 4. Optimize edilen ikili PZR sonrası *Cryptosporidium* sp. ile *Giardia intestinalis*'in ikili PZR jel görüntüsü.



Resim 5. *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* sp. ve *Giardia intestinalis*'in üçlü PZR jel görüntüsü.

Projenin son aşamasında *Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp. ve *G. intestinalis*'in bir arada gerçekleştirilen multipleks PZR optimizasyonu sonucunda aynı jelde sırasıyla oluşan 95, 227 ve 258 bp'lik bantlar Resim 5'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Bağırsak parazitlerinin tanısında dışkı örneklerinin mikroskopik bakışı halen tüm dünyada en yaygın yöntemdir. Kısa sürede sonuç verebilmesi, serum fizyolojik ile inceleme yapıldığında var olan parazitleri canlı saptayabilmesi ve maliyetinin nispeten düşük olması nedeniyle hemen hemen tüm laboratuvarlarda tercih edilmektedir<sup>(1)</sup>. Bununla birlikte, bağırsak parazitlerinin her gün dışkıyla atılmıyor oldukları bilirse de<sup>(12)</sup> çoğunlukla hastaya ait tek bir dışkı örneği ile tanı konulmaya çalışıldığından yöntemin duyarlılığı düşük kalmakta, incelemeyi yapan uzmanın tecrübesi de belirleyici olmaktadır. Bağırsak parazitlerinin güvenilir mikroskopik tanısında dışkı örneklerine direkt mikroskopi, yoğunlaştırma ve kalıcı boyalı yayma yöntemlerinin bir arada ve üç kez farklı günlerde uygulanması gerektiği bilinmektedir<sup>(12,27)</sup>. Ancak zaman ve tecrübe gerektiren bu yöntemlerin tümünün dünyada ve ülkemizde üç farklı günde tam olarak

uygulanabildiğini söylemek güçtür. Buna bağlı olarak dünyada bağırsak parazitlerine ait insidansın gerçekte çok daha yüksek olduğu, birçok olgunun tanı sürecinde atıldığı tahmin edilmektedir<sup>(1,11)</sup>. Bu nedenlerle çok sayıda paraziti bir arada saptayabilen hızlı ve güvenilir moleküler yöntemlere gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonunun bağırsak parazitleri için rutin tanıda kullanımı her geçen gün ucuzlamakta ve yaygınlaşmaktadır. Bugün çalışan personelin maliyetleri ile kıyaslandığında rutin parazitolojik tanı için çok sayıda örneğe PZR ile tanı konulmasının daha düşük maliyetli olduğu hesaplanmaktadır<sup>(28)</sup>. Ayrıca, bağırsak parazitlerinin tanısında moleküler tanı yöntemlerinin geleneksel tanı yöntemlerine kıyasla çok daha duyarlı ve özgün olduğunu, tek bir dışkı incelemesiyle dahi hastaya tanı konulabildiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur<sup>(15,29-33)</sup>. Son yıllarda yapılan bu çalışmalar sonrasında, gerçek zamanlı PZR'nin bağırsak parazitlerinin tanısında "altın standart" olarak alınabileceği ileri sürülmüştür<sup>(15,32)</sup>.

Multipleks PZR ile tek bir test süresinde daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden son yıllarda mikrobiyolojinin çoğu alanında yaygın kullanılmaya başlanılmıştır<sup>(17,22)</sup>. Testin başarıyla sonuçlandırılabilmesi için test içindeki tüm mikroorganizmaların çoğaltılabileceği uygun sıcaklık ve test sürelerinin tespit edilebilmesi esastır; bu nedenle de optimizasyonu uzun ve zorlu olabilmektedir. Son birkaç yıldır en sık enfeksiyona yol açan *Entamoeba histolytica*, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp. ve *Dientamoeba fragilis* gibi bağırsak parazitlerinden birkaçını saptayabilen multipleks PZR panelleri geliştirildiğini bildiren çalışmalar yayınlanmaktadır<sup>(20,32-34)</sup>. Ayrıca ishal etkeni patojenlerini saptamaya yönelik geliştirilmiş ticari kitler de bulunmaktadır; bu kitlerin yüksek maliyetleri göz önüne alındığında araştırma laboratuvarlarının yerli halkta enfeksiyon yapan etkenleri kullanarak, kendi olanaklarıyla yüksek etkinliğe sahip özgün multipleks PZR protokolleri oluşturmaları halen cazibesini korumaktadır. Biz de bu amaçla, laboratuvar olanaklarımızı kullanarak hastalarımızda sık enfeksiyona yol açtığını önceden bildiğimiz *G. intestinalis*, *Blastocystis*

sp., ve *Cryptosporidium* sp. için bir multipleks PZR protokolü oluşturmayı hedefledik. Çalışmalar sonucunda üç parazitin aynı anda optimize edilmiş olarak saptanabildiği özgün bir multipleks PZR protokolü geliştirilmiştir. Bu şekilde tasarlanan primerlerle elde edilen ampliconların *G. intestinalis* için 258 bp, *Blastocystis* sp. için 227 bp ve *Cryptosporidium* sp. için ise 95 bp uzunluğunda olduğu görülmüştür. Testin başındaki denemelerde, *Giardia* sp. tek başına çoğaltıldığında 258 bp uzunluğunda bir bant oluşurken, *Cryptosporidium* sp. ile ikili çoğaltıldığında kullanılan primer dizisiyle değil, *tpi* geninin farklı bir bölgesinden hazırlanan diziyle çoğaltılabildiği ve bu defa 113 bp uzunluğunda bant oluşturabilmiştir. Çalışmanın esas hedefi olan üç parazitin bir arada çoğaltılabilmesi ise ilk başta kullanılan ve çalışmanın "Gereç ve Yöntem" bölümünde dizisi verilen primerlerle gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, sonradan sentezlettilen ve sadece *Giardia* sp. ile *Cryptosporidium* sp.'nin birlikte çoğaltılmasına yarayan primer dizisine karışıklığa yol açmamak için yer verilmemiştir. Sonuç olarak, çalışmada hedeflendiği şekilde üç parazitin optimal koşullarda PZR ile çoğaltılması, "Gereç ve Yöntem" bölümünde açıklanan gen bölgeleri ve primer dizileri ile gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmanın kısıtlılığı üçlü parazit tanısında multipleks PZR yönteminin optimizasyonunu hedefleyen bir ön çalışma olması nedeniyle sağlıklı ve hasta gruplarıyla duyarlılık ve özgüllük hesaplamalarının yapılamamış olmasıdır. Takip eden araştırmalarda bu durumun dikkate alınarak optimize edilen yeni protokolün konvansiyonel PZR ve mikroskopiye göre duyarlılık ve özgüllüğünün saptanması planlanmaktadır.

Bu yöntemin rutin dışkı incelemeleri için kullanıma girmesiyle mikroskobik bakıda gözden kaçabilen söz konusu parazitlerin saptanabilmesi mümkün olacak ve bu sayede hastalara etkin tanı ve tedavi verilmesi sağlandığı gibi, toplum sağlığına da katkı sağlanmış olacaktır. Gelecekte bu üç parazite ek olarak *E. histolytica*, *D. fragilis* ve *Cyclospora cayatanensis*'in de optimize edilip bu protokole dahil edilmesi planlanmaktadır. Bu gerçekleştiğinde, başta immün yetmezlikli hastalar olmak üzere gastrointestinal sistem

yakınmaları olan tüm hastalara özel bir "Bağırsak Parazitleri Paneli" geliştirilmiş olacak ve bu sayede laboratuvarlarda parazitolojik incelemede dışkı örneklerine farklı yöntemlerin kullanılmasındaki zorluklar nedeniyle çok sayıda parazitin tek bir moleküler yöntemle saptanması mümkün hale gelebilecektir.

**Etik Kurulu Onayı:** Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul tarafından (18.08.2011 tarih ve 275 kayıt numarası) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu araştırma Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TIP 2010-121 no.lu proje olarak desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Celal Bayar University, Research Ethics Committee (08.18.2011/275).

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

**Funding:** Celal Bayar University, Scientific Research Committee (Project No: TIP 2010-121)

## KAYNAKLAR

1. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. In: Intestinal Protozoa Amebae. Third Edition American Society for Microbiology, Washington DC Press, 1997:25-30.
2. Korpe PS, Ravdin JI, Petri WA. Introduction to Protozoal Diseases. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Eds: Bennett, JE, Dolin R, Blaser MJ. Ninth Edition. Philadelphia, PA. Elsevier. 2020:3270-2.e1.
3. Gürbüz CE, Gülmez A, Özkoç S, ve ark. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2011-2018 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg. 2020;44(2):83-7. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6662>
4. Çiçek AC, Direkel Ş, Ulsan Gündoğdu DZ, Ertürk A, Sarı A. Rize İlinde Üniversite ve Devlet Hastanelerine başvuran hastalarda görülen bağırsak parazitlerinin dağılımı. Int J Basic Clin Med. 2013;1(2):78-82.
5. Taş Cengiz Z, Yılmaz H, Beyhan YE, Çiçek M. Geniş kapsamlı bir retrospektif çalışma: Van yöresinde insanlarda intestinal parazitler. Türkiye Parazit Derg.

- 2019;43(2):70-3.  
<https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.5997>
6. Polat E, Özdemir S, Sirekbasan S. İstanbul'da Bir Üniversite Hastanesine başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı: Yedi yıllık retrospektif analiz. *Türkiye Parazit Derg.* 2020;44(3):139-42.  
<https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6653>
  7. Ogbera AO, Anaba E. Protozoa and endocrine dysfunction. 2021 Mar 14. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al. editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–.
  8. Sürmeli A, Tolunay T, Yasin Y, et al. Child health, parasites and lower socioeconomic status: Outcomes of a long-term screening, intervention and training study by health volunteers in rural Nepal. *Acta Trop.* 2020;202:105263.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105263>
  9. Ok ÜZ, Üner A, Korkmaz M. *İmmun yetmezlikte önemi olan parazitler hastalıkları kitabında*. *Blastocystosis*, Özcel MA ed. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 12*, Bornova, İzmir, 1995:43-9.
  10. Caner A, Zorbozan O, Tunali V, et al. Intestinal protozoan parasitic infections in immunocompromised child patients with diarrhea. *Jpn J Infect Dis.* 2020;73(3):187-92.  
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.054>
  11. Özyurt M, Kurt Ö, Yaman O, Ardic N, Haznedaroğlu T. Bir eğitim hastanesi koproloji laboratuvarında geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazit Derg.* 2007;31(4):306-8.
  12. Limoncu ME, Ok ÜZ. Taze dışkı örneğinin toplanması, tespit edilmesi ve nakli. *Parazitolojide Laboratuvar kitabında*. (ed) Korkmaz M, Ok ÜZ. Meta basım, İzmir, 2011:9-16.
  13. Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Makroskopik inceleme ve taze dışkı incelemeleri. *Parazitolojide Laboratuvar kitabında*. (ed) Korkmaz M, Ok ÜZ. Meta basım, İzmir, 2011:17-22.
  14. Girginkardeşler N, Ok ÜZ. Kalıcı boyalı yaymalar. *Parazitolojide Laboratuvar kitabında*. (ed) Korkmaz M, Ok ÜZ. Meta basım, İzmir, 2011:29-36.
  15. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(1):232-5.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.232-235.2006>
  16. Emisiko J, Shaviya N, Shiluli C, et al. Comparison of microscopy and PCR for detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in human stool specimens in a resource limited setting in Western Kenya. *Ethiop J Health Sci.* 2020;30(6):891-6.  
<https://doi.org/10.4314/ejhs.v30i6.6>
  17. Li W, Zhang N, Gong P, et al. A novel multiplex PCR coupled with Luminex assay for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. *Vet Parasitol.* 2010;11;173(1-2):11-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.024>
  18. Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö. Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2011;8(1):43-51.
  19. Tilmanne A, Martiny D, Quach C, et al. Enteropathogens in paediatric gastroenteritis: comparison of routine diagnostic and molecular methods. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(12):1519-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.021>
  20. Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis/parvum*, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. *PLoS One.* 2019;14(4):e0215068.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215068>
  21. Usluca S, Eken Berberoğlu AE, Çelebi B, Kılıç S. *Cryptosporidium* spp.'nin realtime PCR yöntemi ile saptanması için metot verifikasyon çalışması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg.* 2019;49(3):162-8.  
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2019.162>
  22. Autier B, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex™ GI-Helminth(I) Assay, the first marketed multiplex PCR for helminth diagnosis. *Parasite.* 2021;28:33.  
<https://doi.org/10.1051/parasite/2021034>
  23. Coklin T, Farber JM, Parrington LJ, Bin Kingombe CI, Ross WH, Dixon BR. Immunomagnetic separation significantly improves the sensitivity of polymerase chain reaction in detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23(2):260-7.  
<https://doi.org/10.1177/104063871102300210>
  24. Görgün S. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde (Manisa) giardiasis tanısı konulan olgularda *Giardia intestinalis* genotiplerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılması. [Yüksek lisans uzmanlık tezi]. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa 2011.
  25. Balcıoğlu C, Kurt O, Sevil N, ve ark. Genotyping of *Giardia lamblia* in a cohort of Turkish patients: A search for a relationship between symptoms and genotypes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012;18(Suppl-A):125-31.  
<https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.5968>
  26. Menounos PG, Spanakos G, Tegos N, Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. Direct detection of

- Blastocystis* sp. in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Mol Cell Probes*. 2008;22(1):24-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.06.007>
27. Autier B, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex™ gastrointestinal panel-parasite assay for protozoa detection in stool samples: A retrospective and prospective study. *Microorganisms*. 2020;8(4): 569.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040569>
28. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, et al. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: Clinical Trial. *J Clin Microbiol*. 1998;36(4):995-8.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.995-998.1998>
29. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2): 308-12.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0447>
30. Roser D, Simonsen J, Nielsen HV, Stensvold CR, Molbak K. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(10):1303-10.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-013-1880-2>
31. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, et al. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):257-62.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01796-10>
32. Nazeer JT, El Sayed Khalifa K, von Thien H, et al. Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitol Res*. 2013;112(2):595-601.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-012-3171-8>
33. Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clin Lab Med*. 2015;35(2): 461-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.006>
34. Jerez Puebla LE, Núñez-Fernández FA, Fraga Nodarse J, et al. Diagnosis of intestinal protozoan infections in patients in Cuba by microscopy and molecular methods: advantages and disadvantages. *J Microbiol Methods*. 2020;179:106102.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106102>

## Eğirdir Gölü'nde (Isparta) *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. Varlığının Araştırılması<sup>§</sup>

### Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Lake Eğirdir (Isparta)

Tuğba Sağlam\*<sup>Ⓜ</sup>, Serdar Düşen\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Meral Apaydın Yağcı\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Abdülkadir Yağcı\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>

\* Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bolu, Türkiye

\*\* Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kınıklı Kampüsü, Denizli, Türkiye

\*\*\* Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü - SAREM, Eğirdir, Isparta, Türkiye

**Atf/Cite as:** Sağlam T, Düşen S, Apaydın Yağcı M, Yağcı A ve ark. Eğirdir Gölü'nde (Isparta) *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. varlığının araştırılması, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):363-7.

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada, Isparta ili sınırları içerisinde yer alan içme, tarımsal sulama ve reaksiyonel amaçlı kullanılan Eğirdir Gölü'nde *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. parazitlerinin varlığı saptanarak mevsimsel açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Araştırma, Temmuz 2016 - Ocak 2017 tarihleri arasında yapılmıştır ve Eğirdir Gölü'ndeki 5 farklı istasyondan 3 farklı mevsimde su örnekleri alınmıştır. Örnekler direkt bakı (Native-Lugol) ile incelendikten sonra Modifiye Asit Fast (MAF) ile boyanmıştır. Preparatlar ışık mikroskopunda parazitolojik açıdan değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmada mevsimsel açıdan incelenen 15 su örneğinde yaz aylarında *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. varlığı saptanmıştır. Eğirdir Gölü'nde mevsimsel olarak en fazla yaz aylarında ortalama % 99.2 yoğunluk ile *Cryptosporidium* spp., daha sonra %93.3 yoğunluk ile de *Giardia* spp. varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmada sonbahar ve kış aylarında da parazitler yine yoğun bir şekilde tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Eğirdir Gölü'nün günlük ihtiyaçlarda kullanılması, göl etrafında tarımın yaygın olarak yapılması ve göl etrafındaki bazı bölgelerin otlak alanı olarak kullanılması tespit edilen protozoonların fazla görülmesine sebep olmaktadır. Sonuç olarak çalışmanın yapıldığı Eğirdir Gölü'nde özellikle yüzme turizminin yapıldığı dönemlerde parazitolojik çalışmalar yapılarak, bu bölgedeki insanlarda ve hayvanlardaki protozoon epidemiyolojisinin belirlenmesine yönelik araştırmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca, Eğirdir Gölü'nün içme suyu olarak kullanıldığı bölgelerde halk sağlığı açısından yeterli dezenfeksiyon işlemlerinin yapılması ve gerekli kontrol programlarının planlanması önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., Eğirdir gölü

#### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to assess both the presence and seasonal variability of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Eğirdir Lake within the borders of Isparta province, which is used for drinking, agricultural irrigation and recreational purposes.

**Method:** The research was carried out between July 2016 and January 2017 and water samples were taken from five different stations in three different seasons in Lake Eğirdir. After direct microscopic examination of the samples (Native-Lugol method), they were stained with Modified Acid Fast (MAF), and examined under the light microscope for parasites.

**Results:** *Cryptosporidium* spp and *Giardia* spp were detected in 15 water samples in summer months, with an average density of 99.2% and 93.3% respectively, in Lake Eğirdir. In addition, both parasites were also detected intensively in autumn and winter

**Conclusion:** The use of Lake Eğirdir for daily needs of people, agriculture and recreational purposes cause increase in protozoal density. Thus, it is necessary to conduct parasitological studies on Lake Eğirdir, especially during the periods of swimming tourism, to determine the protozoal epidemiology in humans and animals. In addition, it is important to carry out adequate disinfection processes and plan the necessary control programs in terms of public health in the regions where Lake Eğirdir is used as drinking water.

**Keywords:** *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., lake Eğirdir

**Alındığı tarih / Received:**  
06.02.2021 / 06. February.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
22.06.2021 / 22. June.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23. September.2021

#### ORCID Kayıtları

T. Sağlam 0000-0003-1654-2261  
S. Düşen 0000-0002-9071-9320  
M. Apaydın Yağcı 0000-0002-2108-1853  
A. Yağcı 0000-0002-7897-1734

✉ tugbasaglam32@hotmail.com

<sup>§</sup> Bu araştırma, 5-8 Temmuz 2017 tarihinde Minsk Belarus'ta düzenlenen 'The 3rd International Symposium on Euroasian Biodiversity (SEAB 2017)' sempozyumunda poster olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Eğirdir Gölü, Türkiye'nin ikinci en büyük tatlı su gölüdür. Doğal içme suyu havzası olmasının yanı sıra biyolojik çeşitlilik değerleri bakımından da uluslararası öneme sahip bir sulak alan olmasından dolayı Türkiye için oldukça önemli bir değerdir. Göller Bölgesi'nde kuzey güney doğrultusunda uzanan, yıl boyunca hareketli bir göldür<sup>(1)</sup>. Dünya tatlı su kaynaklarının gün geçtikçe yetersiz kalması ve artan nüfus, suların daha dikkatli ve titiz kullanılmasını gerektirmektedir. Tatlı su insanlar tarafından; içme suyu, hayvancılık, tarım arazilerinin sulanması ve su ürünleri yetiştiriciliği gibi faaliyetlerde kullanılmaktadır. İnsanların yaşamını doğrudan etkileyen suyun varlığının yanı sıra suyun kalitesi de en az suyun varlığı kadar önemlidir<sup>(2)</sup>. İçme suyu kullanımı oral-fekal enfeksiyon zincirinin en önemli halkasıdır<sup>(3)</sup>. Çevreye insan ve hayvan dışkıları ile atılan parazit oookistleri ve/veya kistleri içme ve kullanma suları, eğlence amaçlı kullanılan sular aracılığıyla insanlara bulaşarak enfeksiyon oluşturmaktadır. Sularda bulunabilen ve insan sağlığı açısından zararlı biyolojik etkenler virüsler, patojen bakteriler ve parazitlerdir<sup>(4-6)</sup>. Bulaşıcı hastalıkların çoğu insanlara kontamine sulardan bulaşmaktadır. Her yıl yarıdan fazlasını çocukların oluşturduğu yaklaşık beş milyondan fazla kişi, su kirliliğine bağlı olarak hayatını kaybetmektedir<sup>(7-10)</sup>. İçme sularına ve kullanma sularında parazit kontaminasyonunun oluşturduğu riskler, bu sulara kanalizasyon ve nehir sularının karışması ve kirliliğiyle bahçelerin sulanmasının engellenmesi ile azaltılabilir. Ayrıca suyla bulaşan enfeksiyonların önüne geçilmesi büyük

ölçüde suyun bakteriyel ve parazitik kontaminasyonunun engellenmesi ve suyun dezenfekte edilmesi ile sağlanmalıdır<sup>(3)</sup>. Paraziter hastalıklar, özellikle büyüme çağındaki çocukları ve neredeyse toplumun çoğu kesimini etkilemektedir. Genellikle asemptomatik veya atipik, nonspesifik bulgularla seyreden bağırsak parazitozları, zihinsel ve bedensel gelişme geriliği (bodurluk), düşüklere neden olmasının yanı sıra işgücü kaybına neden olarak sağlık ve ekonomik yönden etkilerini göstermektedirler<sup>(11-14)</sup>.

Son yıllarda yurt dışında sularda protozoon parazitlerin tespiti ve bulaş yollarına ilişkin çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Ancak Türkiye'de su kaynaklı *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. hakkında sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Araştırma alanı olarak belirlenen Eğirdir Gölü'nde sadece 2007 yılında Rad ve ark.<sup>(6)</sup> su kökenli protozoonları araştırmışlardır. Bu çalışma haricinde Eğirdir Gölü'nde protozoon parazitlere yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda Eğirdir Gölü'nün halk sağlığı açısından önemli bir sağlık riski oluşturan *Giardia* spp. ve *Cryptosporidium* spp. parazitleri açısından araştırılması ve mevsimsel olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Isparta il sınırları içerisinde yer alan Eğirdir Gölü'nü kapsamaktadır. Araştırmada Temmuz 2016– Ocak 2017 ayları arasında Eğirdir Gölü'nden belirlenen beş farklı istasyondan (Resim 1) üç farklı mevsimde onar litrelik tek kullanımlık plastik bidonlar ile toplamda 15 su örneği alınmıştır. Su örneklerine 10



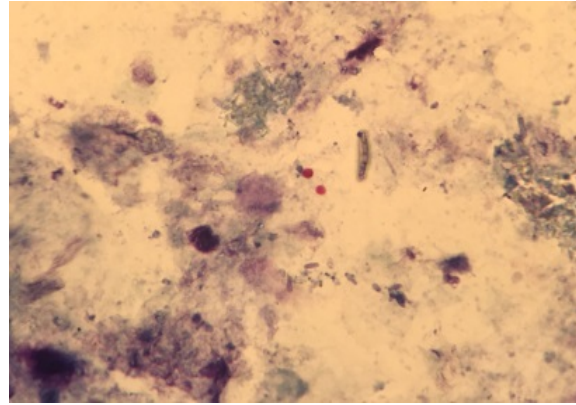
Resim 1. Eğirdir Gölü'nden örnek alınan istasyonlardan görünüm.

ml alüminyum sülfat  $Al_2(SO_4)_3$  eklenerek pH 5.4–5.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çökmenin gerçekleşmesi için örnekler yaklaşık 20-24 saat karanlık koşulda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örneklerin üst kısmındaki süpernatant bir L kalana kadar atılmıştır ve daha sonra 2100 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı atılarak 50 ml'lik pellet kullanılmaya kadar +4°C'deki buzdolabında saklanmıştır.

Santifüj işleminden sonra elde edilen 50 ml'lik pelletten yayma preparatlar hazırlanarak önce direkt baki (Native-Lugol) ile 40x objektifte *Giardia* spp. ve 100x objektifte immersiyon yağı ile *Cryptosporidium* spp. yönünden taranmıştır. Benzer şekilde su örneklerinden yayma preparatlar hazırlanarak Modifiye Asit Fast (MAF) boyanmıştır ve 100x objektifte *Cryptosporidium* spp. varlığı açısından taranmıştır.

## BULGULAR

Çalışmada Temmuz 2016-Ocak 2017 ayları arasında Eğirdir Gölü'nden üç farklı mevsimde toplamda 15 adet su örneği incelenmiştir. İncelenen su örneklerinde yaz aylarında *Cryptosporidium* spp. (Resim 3) ve *Giardia* spp. (Resim 4) varlığı oldukça yaygın olarak gözlenmiştir. Tablo 1 incelendiğinde ise, Eğirdir Gölü'nde mevsimsel olarak en fazla yaz aylarında ortalama % 99.2 yoğunluk ile *Cryptosporidium* spp., daha sonra %93.3 yoğunluk ile de *Giardia* spp. varlığı tespit edilmiştir (Tablo 1, Resim 3). Ayrıca, çalışmada sonbahar ve kış aylarında da parazitler yine yoğun bir şekilde tespit edilmiştir.

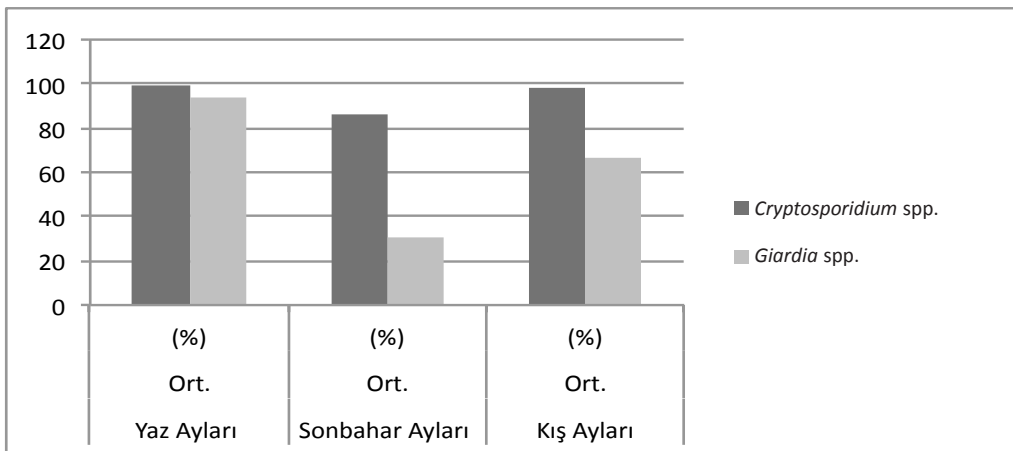


Resim 3. Modifiye asit fast boyası ile boyanmış *Cryptosporidium* spp. oocistleri (100x).

Tablo 1. Eğirdir Gölü'nden tespit edilen parazitlerin aylara göre dağılımı

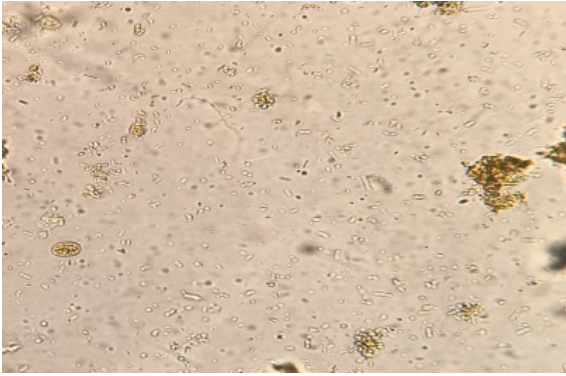
Tespit Edilen Parazit	Toplam İncelenen Örnek Sayısı	Yaz Ayları Ort. (%)	Sonbahar Ayları Ort. (%)	Kış Ayları Ort. (%)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	15	99.2	86	97.7
<i>Giardia</i> spp.	15	93.3	31.1	66.6

Çalışmada Temmuz 2016–Ocak 2017 ayları arasında Eğirdir Gölü'nden üç farklı mevsimde toplamda 15 adet su örneği incelenmiştir. İncelenen su örneklerinde yaz aylarında *Cryptosporidium* spp. (Resim 3) ve *Giardia* spp. (Resim 4) varlığı oldukça yaygın olarak gözlenmiştir. Tablo 1 incelendiğinde ise, Eğirdir Gölü'nde mevsimsel olarak en fazla yaz aylarında ortalama %99.2 yoğunluk ile *Cryptosporidium* spp., daha sonra %93.3 yoğunluk ile de *Giardia* spp. varlığı tespit edilmiştir (Tablo 1, Resim 2). Ayrıca, çalışmada sonbahar ve kış aylarında da parazitler yine yoğun bir şekilde tespit edilmiştir.



Resim 2. Eğirdir Gölü'nden tespit edilen parazitlerin aylara göre dağılımı.





Resim 4. Direkt bakıda *Giardia* spp. kisti (40x).

## TARTIŞMA

Hayatımızın vazgeçilmez olan su, taşıyabildiği çeşitli organik-inorganik maddeler ve mikroorganizmalarla birçok hastalığın meydana gelmesine sebep olmaktadır<sup>(15)</sup>. Çalışma alanı olarak belirlenen Eğirdir Gölü'nün de günlük ihtiyaçlarda ve tarımsal amaçlı sulamada kullanıldığı bilinmektedir. Kontamine suların kaynaklanan hastalık ve salgınların engellenmesi için ilk önce insan ve hayvan dışkıları içeren atık suların akarsu, dere, göl veya seyreltme potansiyeli düşük olan koy ve körfezler gibi alıcı ortamlara verilmesinden önce uygun bir dezenfeksiyon işlemi yapılması gerektiği de bildirilmiştir<sup>(16,17)</sup>. Ayrıca klorlamaya karşı son derece dirençli olan bu parazitlerin kontamine olmuş deniz, göl, ırmak ve yüzme havuzlarından bulaşabileceği bilinmektedir<sup>(18)</sup>. Çalışmada tespit edilen *Giardia* spp. insan için en yaygın protozoon enfeksiyonu olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmada %93.3 oldukça yüksek bir yoğunluk ile *Giardia* spp. varlığı saptanmıştır. *Cryptosporidium* spp. ookistleriyle kirlenmiş sular ise hem insanlar hem de hayvanlar için tehlike oluşturmaktadır<sup>(19)</sup>. Çalışmada ortalama % 99,2 yoğunluk ile *Cryptosporidium* spp. varlığı tespit edilmiştir. Rad ve ark.'nın<sup>(6)</sup> 2007'de Isparta ili genelinde yapmış oldukları bir çalışmada yöredeki çeşitli su kaynaklarından aldıkları örneklerde *Cryptosporidium parvum* ve *Giardia intestinalis* varlığını incelemişlerdir. Eğirdir Gölü'nden alınan su örneklerinde *Giardia* kistleri ve *C. parvum* ookistlerini insan aktivitesinin yoğun olduğu plajlarda gözlemişler ve olasılıkla kanalizasyondan fekal bulaşma olabileceğini rapor etmişlerdir. Yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda elde edilen verilerde Rad ve ark.<sup>(6)</sup>

yapmış olduğu çalışma ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda özellikle yaz aylarında tespit edilen parazitlerin varlığının insan aktivitesinden, göl çevresindeki hayvancılıktan ve tarımın yapılmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Sonbahar ve kış mevsimlerinde tespit edilen parazitlerin de atık suların kontaminasyonu sonucu ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (Tablo 1). Mevsimsel olarak, giyariosisin yazları ve erken sonbaharda daha fazla görüldüğünü ve hastalığın belli derecede mevsimsel karakter taşıdığı da bilinmektedir<sup>(20)</sup>. Ayrıca 2007 yılında Rad ve ark.<sup>(6)</sup> tarafından yapılan çalışma ve bizim çalışmamızın verilerine göre Eğirdir Gölü'nde sucul parazitler kaynaklı halk sağlığı riskinin halen devam ettiği net bir şekilde görülmektedir. Castro-Hermida ve ark.<sup>(21)</sup> 2007 yılında İspanya'nın Tambre Irmağı'ndan 22 kaynaktan ve üç önemli ırmak ağzından 50 L'lik su örneği toplamışlardır. Çalışma sonucunda su örneklerindeki *Cryptosporidium* ookist miktarı ve *Giardia* kist miktarı sonbahar ve kış aylarına göre bahar ve yaz aylarında çok yüksek çıkmıştır. Wilkes ve ark.<sup>(22)</sup>, tarım arazilerinin yoğun olduğu bölgelerdeki yüzey sularında *Cryptosporidium* ookisti, *Giardia* kisti, patojenik bakteriler ve indikatör bakteriler arasındaki mevsimsel ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma sonucuna göre sonbahar ve kış dönemlerinde indikatör bakterilerle beraber parazitlerin sayılarının da arttığı gözlenmiştir. *Cryptosporidium* spp. ookistleri sonbahar (Eylül, Ekim) mevsiminde artış göstermiştir. Çalışmamız da ise Eğirdir Gölü'nde mevsimsel olarak Temmuz ve Ağustos aylarında sayıca en fazla ve yoğun olarak *Cryptosporidium* spp. daha sonra *Giardia* spp. tespit edilmiştir.

Eğirdir Gölü'nün Isparta ilindeki bazı bölgelerde içme suyu olarak kullanıldığı bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre de bulaşıcı hastalıkların %70'i insanlara kontamine sulardan bulaşmaktadır<sup>(23)</sup>. Bağırsak hastalıkları, ishal, Hepatit A, Hepatit E, dizanteri, koli basili, kolera, parazit enfeksiyonları gibi birçok hastalık su yolu ile bulaşmaktadır. Özellikle kentsel yerleşimin kurulu olduğu bölgelerde kullanılan içme suyu insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu sebeple içme sularının azami ölçüde her türlü kontaminasyondan uzak tutulması, söz konusu parazitlerin klorlamaya dirençli olması da göz önüne alınırsa şehir suyu şebekelerinde etkili biyolo-

jik arıtma (süper klorlama, ozonlama, filtrasyon, kaynatma vb.) sistemlerinin uygulanması gerekmektedir. Toplum sağlığı açısından da, özellikle paraziter hastalıklar konusunda ve kişisel hijyenin önemliliği hakkında toplumsal bilgilendirme çalışmalarının artırılması son derece önem arz etmektedir. Çalışma sonucuna göre, Eğirdir Gölü'nde hastalık riskinin halen mevcut olduğunu ve paraziter hastalıklar yönünden henüz herhangi bir tedbir alınmadığı açık bir şekilde görülmektedir. Parazitlerin suya bir kere karıştıktan sonra halk sağlığına, çevreye ve ekonomiye ne kadar çok zarar verebileceği düşünüldüğünde insan ve çevre sağlığı açısından bu konu ile gerekli çalışma ve tedbir önlemlerinin bir an önce alınması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, elde edilen verilere göre kontrol programlarının hazırlanması ile bölgedeki halk sağlığını korumaya yönelik olumlu sonuçlar doğuracağı düşünülmektedir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

## KAYNAKLAR

1. Bolat Y, Koca HU, Yıldırım UG, ve ark. Eğirdir Gölü makrofitlerinin gelişme ve yayılma özelliklerinin sualtı gözlemleri ile izlenmesi. J Limnol Fresh Water Fish Res. 2015;1(3):103-11. <https://doi.org/10.17216/LimnoFish-5000128523>.
2. Egemen Ö, Sunlu U. Su Kalitesi. İzmir: Ege Üniversitesi Su Ürünler Fakültesi. Yayınları, 1996.
3. Anonim. Suyun canlılar için önemi. <http://www.diyadinnet.com/YararlıBilgiler-933&Bilgi=suyun-canlılar-icin-onemi-> 2013. (Erişim tarihi: 13.Aralık.2018)
4. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, 2004.
5. Karaman Ü, Kolören Z, Demirel E, Ayaz E, Seferoğlu O. Giresun ili'ndeki sularda parazitlerin varlığı. Dicle Tıp Derg. 2013;43(4):521-6.
6. Rad AY, Aysal S, Taner M. Investigation of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in various water sources in Isparta Area, Turkey. Hacettepe J Biol Chem. 2007;35(3):209-17.
7. Eren G, Bilgiç A, Karlı B, Miran B. GAP Bölgesi'nde kaliteli içme suyunun fiyatlandırılmasına etki eden faktörler. Tarım Ekonomisi Derg. 2008;14(2):67-74.
8. Ardıç N. İçme sularında parazit ve diğer patojenlere karşı dezenfeksiyon uygulamaları ve ara konaklarla mücadelede kullanılan kimyasallar. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 4-8 Nisan 2007, Antalya; 2007.
9. Demirel E, Kolören Z. Ordu İli Melet Irmağı'ndan alınan su örneklerinde *Toxoplasma gondii* yayınlığının Nested PZR ile tespiti. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir; 2012.
10. UN GEMS/Water Programme Office. Water quality outlook. UNEP Global Environment Monitoring System. 2007. [<https://wedocs.unep.org/20.500.11822/9422>] (Erişim Tarihi: 13.05.2018)
11. Yazar S, Yaman O, Gözkenç N, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg. 2005;29(4):261-3.
12. Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections - fifty years on. Parasitol Today. 1997;13(11):438-43. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(97\)01144-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(97)01144-7)
13. Mehraj V, Hatcher J, Akhtar S, et al. Prevalence and factors associated with intestinal parasitic infection among children in an urban slum of Karachi. PloS One. 2008;3(11):e3680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003680>
14. Stephenson LS, Latham MC, Ottesen E. Malnutrition and parasitic helminth infections. Parasitology. 2000;121(S1):S23-38. <https://doi.org/10.1017/s0031182000006491>
15. Miman Ö, Aktepe OC. İçme sularında protozoon parazitlerin dezenfeksiyonu. Kocatepe Tıp Derg. 2008;(9):31-5. <https://doi.org/10.18229/ktd.01461>
16. Uslu O, Türkman A. Su kirliliği ve kontrolü. İzmir: T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi; 1987.
17. Demirel E, Kolören Z. Ordu İli Melet Irmağı'ndan alınan su örneklerinde *Toxoplasma gondii* yayınlığının nested PZR ile tespiti. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir; 2012.
18. Baque RH, Gilliam AO, Robles LD, et al. Areal-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. Water Res. 2011;(45):3175-84. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.032>
19. Ok ÜZ, Balcioğlu İC. Cryptosporidiosis. Tıbbi Parazit Hastalıkları. In: Özcel MA (Ed.) İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 2007:363-77.
20. Karaman Ü, Kolören Z, Seferoğlu O, Ayaz E, Demirel E. Samsun il ve ilçelerden alınan çevresel sularda parazitlerin varlığı. Türkiye Parazit Derg. 2017;41(1):19-21. <https://doi.org/10.5152/tpd.2017.3574>
21. Castro-Hermida JA, Garcia-Precedo I, Almeida A, et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. Water Res. 2009;(43):4133-42. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.020>
22. Wilkes G, Thomas E, Gannon V, et al. Seasonal relationships among indicator Bacteria, Pathogenic Bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. Water Res. 2009;(43):2209-23. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.033>.
23. Eren G, Bilgiç A, Karlı B, et al. GAP Bölgesi'nde kaliteli içme suyunun fiyatlandırılmasına etki eden faktörler. Tarım Ekonomisi Derg. 2008;14(2):67-74. <https://doi.org/10.17755/esosder.289668>

# Bakteriyemi Etkeni Gram Negatif Bakterilerin Hızlı Tanımlanmasında Mikroarray ve Lizis Filtrasyon Sonrası MALDI TOF MS Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

## *Evaluation of Microarray and Lysis Filtration Combined MALDI TOF MS Procedures for the Identification of Gram Negative Bacteremia*

Mehmet Soylu\*<sup>©</sup>, Ayşe Arslan\*\*<sup>©</sup>, Şöhret Aydemir\*<sup>©</sup>, Alper Tünger\*<sup>©</sup>

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

\*\* Sağlık Bakanlığı Üniversitesi, Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Bursa, Türkiye

**Atf/Cite as:** Soylu M, Arslan A, Aydemir Ş, Tünger A. Bakteriyemi etkeni Gram negatif bakterilerin hızlı tanımlanmasında mikroarray ve lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS yöntemlerinin değerlendirilmesi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):368-74.

### Öz

**Amaç:** Sepsis olgularında yanlış antimikrobiyal tedavi alan veya tedavi almayan olgularda ölüm oranları kaybedilen her saat başına artış göstermektedir. Bu çalışmada, etkenin konvansiyonel kültür yöntemine oranla daha hızlı tanımlanabilmesi amacıyla konvansiyonel kan kültürü/MALDI TOF yöntemi ile lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS (LFM) ve mikroarray yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Kasım 2015-Şubat 2016 tarihleri arasında Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Erişkin Yoğun Bakım ünitelerinde izlenen hastalardan alınan kan kültürü örneklerindeki 39 Gram negatif etkene mikroarray ve LFM işlemi uygulanıp, ardından MALDI TOF sistemi ile çalışıldı. Bakteri kolonisinden yapılan MALDI TOF tür düzeyinde tanımlama ile lizis filtrasyon sonrası uygulanan MALDI TOF ve mikroarray test yöntemlerinin sonuçları karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Kan kültürü cihazındaki pozitif sinyal süreleri en kısa yedi saat 55 dakika, en uzun 31 saat 22 dakika, ortalama pozitiflik süresi 12 saat 55 dakika olarak belirlendi. Kültür sonrası MALDI TOF identifikasyonu ile LFM identifikasyonun duyarlılığı %82 (32/39), mikroarray yönteminin ise duyarlılığı %87.1 olarak hesaplandı. Lizis filtrasyon sonrası uygulanan MALDI TOF ile mikroarray yöntemlerinin birbirleri ile benzerliği %79.4 (31/39), her üç yöntemin birlikte tutarlı sonuç verdiği örneklerin oranı ise %76.9 (30/39) olarak hesaplandı. En sık saptanan üç etken *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.* ve *Escherichia spp.* kültür sonrası MALDI TOF ve LFM yöntemi ile uyumu Cohen'in kappa katsayısı sırası ile 0.715, 0.843, 0.938; mikroarray yöntemi ile uyumu 0.935, 0.753, 0.938 olarak hesaplandı ve her üç bakteri için de yüksek uyumluluk elde edildi.

**Sonuç:** Elde edilen verilere dayanılarak, hem lizis filtrasyon hem de mikroarray platformunun sepsis tanısını kısaltmaları açısından yararlı olduğu düşünülmüştür. Lizis filtrasyon yöntemi maliyet etkinliği açısından önde bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Sepsis, matrix-yardımlı laser desorpsiyon-ionizasyon kütle spektrometrisi, filtrasyon, mikroarray analizi

### ABSTRACT

**Objective:** Each hour of delay in antibiotics administration increases mortality in sepsis. The aim of this study was to decrease the bacteria identification time to initiate appropriate antibiotic treatment as early as possible.

**Method:** Tests were applied to 39 Gram negative bacteria isolated from blood cultures sent to our laboratory from intensive care units between November 2015- February 2016. The results of bacterial identification tested on both microarray and LFM methods were compared.

**Results:** In the comparison of MALDI-TOF MS after sub-culture, MALDI-TOF after lysis centrifugation and microarray methods, sensitivity was determined as 82% (32/39) in LFM and as 87.1% (34/39) in the microarray method. All three methods had a concordance of 76.9% (30/39). Most common species identified in this study were *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella spp.* and *Escherichia spp.*, and their Cohen's Kappa coefficients for LFM and post-subculture MALDI were calculated as 0.715, 0.843, and 0.938, respectively. In addition, their BC-GN microarray and post-subculture MALDI concordance rates calculated with Cohen's Kappa were 0.935, 0.753 and 0.938, respectively. Both methods showed good correlations with the post-culture MALDI method.

**Conclusion:** Lysis centrifugation and microarray platforms decrease the identification time in blood culture processing successfully. Results of this study suggest that for the laboratories with MALDI-TOF mass spectrophotometer, the lysis filtration method is a fast and cost-effective method that may be suitable for routine procedures.

**Keywords:** Sepsis, matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry, filtration, microarray analysis

**Alındığı tarih / Received:**  
29.03.2021 / 29.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
13.07.2021 / 13.July.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

M. Soylu 0000-0002-9145-1506  
A. Arslan 0000-0002-4934-4889  
Ş. Aydemir 0000-0001-8354-9100  
A. Tünger 0000-0002-1644-8833

✉ mehmet.soylu@ege.edu.tr

## GİRİŞ

Kanda bakteri bulunması bakteriyemi olarak belirtilirken, bakteriyemi tablosunun devamı sonucu, immünolojik mekanizmaların da olaya katılmasıyla beliren tablo sepsis olarak tanımlanır<sup>(1)</sup>. Sepsis, yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden, her yıl dünya çapında yaklaşık 18 milyon olguya ve %28-50 olguda da ölüme neden olan bir klinik tablodur<sup>(2)</sup>. Sepsise bağlı ölümlerde yaş, enfeksiyon etkeni, enfeksiyonun kazanıldığı yer ve altta yatan primer hastalık önemlidir. Sepsis olgularında ilk 24 saat uygun antimikrobiyal tedaviye başlanması prognoz açısından oldukça önemlidir, yanlış antimikrobiyal tedavi alan veya tedavi almayan olgularda ölüm oranları kaybedilen her saat başına %7.6 oranında artış göstermektedir<sup>(2)</sup>.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyeminin kesin tanısı için kullanılan altın standart yöntem kan kültürüdür<sup>(3)</sup>. Kan kültüründe etkenin üretilmesi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması için en az 48-72 saatlik bir süre gerektiğinden, günümüzde spesifik etkeni aynı gün içerisinde saptayabilen ve saptanan etkenin önemli direnç paternlerinin çalışabileceği moleküler tabanlı testler de kullanılmaya başlanmıştır<sup>(4,5)</sup>.

Bu çalışmada, lizis filtrasyon ve matrix assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI TOF MS) kombine edilerek yapılan identifikasyon ve konvansiyonel kan kültürü sonrası yapılan MALDI TOF MS ile identifikasyon sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (31.07.2014 tarih ve 14-6/3 No.lu karar) onaylanmıştır.

Kasım 2015-Şubat 2016 tarihleri arasında Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Erişkin Yoğun Bakım ünitelerinde takip edilen hastalardan alınan ve BiöMerieux BactALERT™ (BioMérieux, Fransa) kan kültürü sisteminde pozitif sinyal veren kan kültürü

şişeleri değerlendirildi. Sinyal sonrası kan kültürü şişelerinin pozitif sinyal verme süreleri kaydedildi, kan kültürü şişelerinden alınan örnek %5 koyun kanlı agar ve EMB agar besiyerlerine inoküle edildi ve Gram ile boyalı preparatları hazırlandı. İnkübasyon sonrası oluşan koloniler Vitek MALDI TOF MS (BioMérieux, Fransa) sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. Etken Nanosphere Verigene System™ BC-GN mikroarray sisteminin (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) veri tabanında bulunan bakteri grubunun içerisinde ise çalışmaya dâhil edildi.

Eşzamanlı olarak, yönergelere uygun yöntemlerle hazırlanmış solüsyonlar ve gereçler ile doğrudan pozitiflik saptanan kan kültürü şişesinden lizis filtrasyon işlemi uygulanıp ardından Vitek MALDI TOF MS (BioMérieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapıldı<sup>(5)</sup>. Çalışmaya lizis filtrasyon yöntemine uyumlu olmadığı için antibiyotik inhibitörü içeren kan kültürü şişesi alınmadı.

Son olarak aynı kan kültürü şişelerinden alınan 0.7 mL örnek kullanılarak kapalı sistem nükleik asit ekstraksiyon ve amplifikasyon sonrasında nanopartikül problemleri ile çalışan Nanosphere Verigene System BC-GN mikroarray (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) test yöntemi ile Gram negatif etkenin ve direnç genlerinin tanımlanması gerçekleştirildi<sup>(4)</sup>.

Ardından, rutin olarak uygulanan ve bakteri kolonisinden yapılan MALDI TOF MS ile tür düzeyinde tanımlama ile lizis filtrasyon sonrası uygulanan MALDI TOF MS (LFM) ve mikroarray test yöntemlerinin sonuçları karşılaştırıldı. İstatiksel analiz yöntemi olarak Cohen'in Kappa katsayısı SPSS 18.0 programı ile belirlendi<sup>(6)</sup>. En sık saptanan üç bakteri olan *Klebsiella*, *Acinetobacter* ve *Escherichia* türlerinin kültür sonuçları ile lizis filtrasyon ve mikroarray testleri ile uyumu hesaplandı. Cohen'in kappa değerinin değerlendirilmesinde Landis ve Koch'un tablosu kullanıldı<sup>(7)</sup>. Kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemi ile elde edilen sonuç altın standart kabul edilerek duyarlılık hesaplandı<sup>(8)</sup>. Altın standart olarak kullanılan kültür sonrası MALDI TOF MS yönteminin moleküler bir yöntemle verifikasyonu yapılamadığı için özgüllük değerlendirilmedi.

Lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS prosedürü (LFM): Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden alınan 2 mL kan kültürü örneği ile 1 mL lizis tampon çözeltisi (% 0.6 Brij 97+0.4M CAPS; pH=11.7) karıştırıldı ve 5 saniye vortekslenildi. İki dakika sonra elde edilen lizat, 0.45 µm kalınlığında 2 cm çapında bir polietersülfon filtreden 40 saniye boyunca vakumlu aspiratör yardımı ile el yapımı iki yollu bir filtre tutucusu kullanılarak süzüldü. Fothergill ve ark.<sup>(5)</sup> çalışmasında, kullanılan filtre tutucu ticari bir firmanın ürettiği olduğu yüksek maliyetli bir filtre tutucu sistemi ile yapılmıştır fakat bu çalışmada demir boruların tutturulması ile elde edilmiş el yapımı bir filtre tutucu vakum düzeneği hazırlanarak çalışıldı. Filtrede kalan pellet, üç kez 3 ml yıkama tamponu çözeltisi (20 nM Sodyum fosfat +% 0.05 Brij 97 +% 0.45 NaCl, pH=7.2) ile yıkandı. Filtredeki pellet, bir polyester uçlu swab ile (Cleanmo™ TX743, Guandong, Çin) Vitek™ MS tepsisine aktarıldı. Pellet 1 uL CHCA (α-Siyano-4-hidroksisinnamik asit) matrisi ile kaplandıktan sonra identifikasyon Vitek™ MS cihazı aracılığıyla gerçekleştirildi. Filtreleme işleminden sonra, kullanılan filtreler filtre tutucudan çıkarıldı ve filtre tutucu %0.5 sodyum hipoklorit ile temizlendi. Bu yöntemin kan örneği başına toplam maliyeti, hasta başına yaklaşık 13 ABD doları olarak hesaplandı. Örnek hazırlık aşamaları ve Vitek MALDI TOF MS (BioMérieux, Fransa) cihazıyla identifikasyon aşaması yaklaşık 15 dakika sürdü.

Nanosphere Verigene™ BC-GN mikroarray testi: BC-GN mikroarray testi, üretici talimatlarına göre gerçekleştirildi. Bu test, *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* bakterilerinin cins düzeyinde tespiti ve *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens* bakterilerinin tür düzeyinde tespiti için, *rpsA*, *ompA/mrkC*, *gyrB/metB*, *atpD*, *oppA*, *yggE*, *ompA*, *sodA*, *chiC/ampC* genlerini hedefleyen probalara sahip bir mikroarray platformu kullanılmaktadır. Ayrıca *bla*<sub>CTX-M'</sub>, *bla*<sub>KPC'</sub>, *bla*<sub>NDM'</sub>, *bla*<sub>VIM'</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> ve *bla*<sub>OXA</sub> direnç belirleyicilerini de belirleyebilme yeteneğine sahip bir testtir. Çalışma prosedürü olarak her bir örnek için Verigene™ Processor SP'ye bir ekstraksiyon tepsisi, bir test kartuşu ve bir utility tepsisi yerleştirildi. Test kartuşunun numune kuyucuna 700 µl kan kültürü sıvısı örneği konuldu, 2.5 saat

sonra, test kartuşu Verigene™ Processor SP'den çıkarıldı ve reaktif paketi substrat tutucusundan ayrıldı. Substrat tutucu, analiz için Verigene™ okuyucusuna yerleştirildi ve identifikasyon sonuçlandırıldı. Örnek başına BC-GN mikroarray testi için tahmini maliyet 100 ABD Doları olarak hesaplandı. Örnek hazırlık aşamaları ve test aşamalarının sonuçlanmasıyla yaklaşık üç saatte identifikasyon gerçekleştirildi.

## BULGULAR

Kan kültürü pozitiflik sinyal süreleri en kısa 7 saat 55 dakika, en uzun 31 saat 22 dakika, ortalama pozitiflik süresi 12 saat 55 dakika olarak kaydedildi.

Çalışmaya alınan toplam 39 etkenin konvansiyonel kültürden elde edilen koloniler kullanılarak MALDI TOF MS yöntemiyle yapılan identifikasyonunda en sık saptanan üç etken *Klebsiella pneumoniae* (12, %30.76), *Acinetobacter baumannii* (11, %28.2) ve *Escherichia coli* (7, %17.94) olarak sıralanmıştır. Kültür sonrası MALDI TOF yöntemi, LFM ve mikroarray yöntemleri ile elde edilen identifikasyon sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 1'de sunulmuştur.

Dört kültür şişesinden yapılan LFM tanı yöntemiyle sonuç elde edilemezken, iki kan kültürü şişesinden yapılan çalışmada konvansiyonel kültür yöntemiyle elde edildenden farklı bakteri tanımlanması gerçekleştirildi. Lizis filtrasyon yöntemi kullanılarak tanımlama yapılamayan dört şişenin üçünün kültüründe *Acinetobacter baumannii*, bir örnekte de *Citrobacter freundii* identifiye edildi. Farklı cins tayini yapılan iki örnekten birincisinde konvansiyonel yöntemle *Acinetobacter baumannii* olarak identifiye edilen bakteri *Clostridium perfringens*, ikincisinde ise konvansiyonel yöntemle *Klebsiella pneumoniae*, olarak identifiye edilen bakteri *Escherichia coli* olarak tanımlandı.

Çalışmaya alınan 39 örneğin üçünde (%7.69) mikroarray yönteminde "NO\_CALL" hatası alınmış ve bu örnekler "tanımlama yapılmadı" olarak kabul edildi. Mikroarray yöntemiyle tanımlanamayan etkenler kültür ve ardından MALDI TOF yöntemiyle sırasıyla *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens* ve

Tablo 1. Kullanılan üç yöntemle elde edilen identifikasyon sonuçları.

Kültür sonrası VITEK MS sonucu	Kültür sonuç süresi (dakika)	LFM sonucu	Verigene BC-GN mikroarray sonucu	Mikroarray direnç paterni
<i>A. baumannii</i>	651	yok	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>A. baumannii</i>	654	<i>C. perfringens</i>	NO CALL HATASI	
<i>K. pneumoniae</i>	560	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	OXA+CTX-M+NDM
<i>S. marcescens</i>	747	<i>S. marcescens</i>	NO CALL HATASI	
<i>K. pneumoniae</i>	915	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CTX-M
<i>C. freundii</i>	667	yok	<i>C. freundii</i> + <i>Enterobacter</i>	
<i>A. baumannii</i>	590	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>E. coli</i>	475	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>A. baumannii</i>	505	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	
<i>K. oxytoca</i>	630	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	NDM
<i>E. coli</i>	1902	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>E. cloacae</i>	481	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	
<i>C. koseri</i>	724	<i>C. koseri</i>	<i>Citrobacter</i> spp.	CTX-M
<i>K. pneumoniae</i>	691	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	624	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+NDM
<i>A. baumannii</i>	910	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	683	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M
<i>K. pneumoniae</i>	749	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>K. pneumoniae</i>	538	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
<i>A. baumannii</i>	714	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>P. aureginosa</i>	583	<i>P. aureginosa</i>	<i>P. aureginosa</i>	
<i>E. coli</i>	1334	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>A. baumannii</i>	754	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>A. baumannii</i>	662	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	940	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>E. cloacae</i>	538	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	
<i>E. coli</i>	1064	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>C. freundii</i>	688	<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter</i> spp.	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	694	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>A. baumannii</i>	928	yok	<i>Acinetobacter</i> spp.	
<i>E. coli</i>	535	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>P. aureginosa</i>	970	<i>P. aureginosa</i>	<i>P. aureginosa</i>	
<i>E. coli</i>	1271	<i>E. coli</i>	NO CALL HATASI	
<i>K. pneumoniae</i>	508	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>A. baumannii</i>	821	yok	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>A. baumannii</i>	1744	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>E. coli</i>	693	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>K. pneumoniae</i>	508	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>K. pneumoniae</i>	582	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	

Tablo 2. Kültür ile LFM metodları ile en sık saptanan üç etkenin Cohen'in kappa değeri ve uyum değerlendirilmeleri.

Kültür ve LFM uyumu	Cohen'in Kappa değeri	Değerlendirme
<i>Acinetobacter</i> spp	0.715	Önemli derecede uyuşma olması
<i>Escherichia</i> spp	0.843	Neredeyse kusursuz uyuşma olması
<i>Klebsiella</i> spp	0.938	Neredeyse mükemmel uyuşma olması

Tablo 3. Kültür ve mikroarray metodları ile en sık saptanan üç etkenin Cohen'in kappa değeri ve uyum değerlendirilmeleri.

Kültür ve mikroarray uyumu	Cohen'in Kappa değeri	Değerlendirme
<i>Acinetobacter</i> spp	0.935	Neredeyse kusursuz uyuşma olması
<i>Escherichia</i> spp	0.753	Önemli derecede uyuşma olması
<i>Klebsiella</i> spp	0.938	Neredeyse kusursuz uyuşma olması

*Escherchia coli* olarak tanımlandı.

Kültür sonrası MALDI TOF MS identifikasyonu ile LFM yöntemi karşılaştırıldığında %82 (32/39) benzerlik saptandı. Kültür ile kombine MALDI TOF MS altın standart olarak kabul edildiğinde, duyarlılık

%82 olarak hesaplandı. Mikroarray ile kültür yönteminin sonuçları birbiriyle %87.1 (34/39) oranında benzerlik gösterdi. Kültür ile kombine MALDI TOF MS altın standart olarak kabul edildiğinde, duyarlılık %87.1, LFM ile mikroarray yöntemlerinin birbirleri ile benzerliği %79.4 (31/39) saptandı. Her üç yönte-

min birlikte tutarlı sonuç verdiği örneklerin oranı ise %76.9 (30/39) olarak hesaplandı. Kültür yöntemi ile LFM yöntemleri ile en sık saptanan üç etken olan *Acinetobacter*, *Escherichia* ve *Klebsiella* cinsleri ele alınarak iki yöntem arasındaki uyum Cohen'in kappa katsayısı değerleri Tablo 2'de paylaşılmıştır. Aynı şekilde en sık saptanan üç etken ele alındığında, kültür yöntemi ile mikroarray yönteminin uyumundan elde edilen Cohen'in kappa katsayısı değerleri Tablo 3'te sunulmuştur.

## TARTIŞMA

Sepsis, tanısı ve tedavisinde zorluklar yaşanan ve yüksek morbidite ile mortaliteye sahip klinik tablolardan birisidir.

Çeşitli çalışmalarda, sepsislerin %27-74'ünde Gram pozitif bakterilerin, %20-64'ünde Gram negatif bakterilerin etken olduğu, %15 ve daha az oranda ise polimikrobiyal etken izole edildiği gösterilmiştir<sup>(9,10)</sup>. Kan kültüründe izole edilen Gram negatif etkenlerin sıklıkları ülkelere ve bildirilen merkezlere göre değişiklik göstermekle birlikte, ülkemizde yapılan bir çalışmada Gram negatif sepsis etkenleri %57.1 saptanmıştır ve sıklık sırası çoktan aza sırasıyla; *Escherichia coli*, *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Enterobacter* spp, *Proteus* spp olarak bildirilmiştir<sup>(11)</sup>. Çalışmamızdaki olgu sayılarının kısıtlı olması ve sadece Verigene System BC-GN (Nanosphere, ABD) mikroarray sisteminin veri tabanında bulunan bakterilerin çalışmaya alınması nedeniyle, elde edilen veriler ışığında çalışmamızdaki etken dağılımları ülkemizdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında benzer etken dağılımını yansıtmamıştır.

Günümüzde MALDI TOF MS teknolojisinin yaygınlaşmasıyla lizis filtrasyonun ile kombine edilerek başarılı bir hızlı tanı yöntemi geliştirilmiştir. Fothergill ve ark.'nın<sup>(5)</sup> LFM tekniği kullandıkları çalışmasında 131 izolat üzerinde yapılan çalışmada, tür düzeyinde tanımlama uyumu, subkültür sonrası yapılan Vitek MS (bioMérieux, Fransa) uygulaması ile %99 olarak saptanmıştır.

Kültür sonrası MALDI TOF uygulamasının 16s rRNA

genotipleme yerine altın standart olarak kabul edilebilirliği ile ilgili çeşitli görüşler vardır<sup>(8)</sup>. Kültür sonrası MALDI TOF uygulaması ile karşılaştırıldığında bu çalışmada LFM yönteminin duyarlılığı %82 olarak saptanmıştır. Bu çalışmadaki başarı oranının benzer çalışmalara göre düşük olmasının nedeni olarak el yapımı filtre tutucunun teknik olarak kullanım zorluğu yaratması ve çalışılan bakteri sayısının sınırlı olması şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca LFM yönteminin; kullanıcının becerisine dayalı bir yöntem olması, LFM yöntemi ile çoklu etken bulunan ve kömür içeren kan kültürü şişelerinden yapılan çalışmalarda başarı oranının düşük olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir<sup>(5,12)</sup>.

Mikroarray yöntemi, son yıllarda mikrobiyoloji alanında önemli gelişim göstermiş, umut verici bir hızlı tanı yöntemidir<sup>(13,14)</sup>. Mancini ve ark.'nın<sup>(13)</sup> Verigene System BC-GN mikroarray sistemi kullanılarak Gram negatif etkenler üzerinde yapmış oldukları çalışmada, 102 pozitif kan kültürü çalışılmış ve konvansiyonel kültür yöntemiyle %97.9 oranında uyumlu sonuç bulunmuştur. Yapılan bir maliyet/etkinlik çalışmasında Hill ve ark.<sup>(14)</sup> Verigene System BC-GN yönteminin hastalara doğru antibiyoterapi başlanmasını 33 saat daha erkene aldığını ve 33 hastanın dâhil edildiği bu çalışmada antibiyotik ve diğer ek hasta giderlerinde 70.000 ABD Doları tasarruf sağlandığı bildirilmiştir. Kim ve ark.'nın<sup>(15)</sup> bu çalışmada, kullandığımız LFM ve mikroarray yöntemlerinin kullanıldığı benzer çalışmada iki yöntem arasındaki uyumun %99.1 olarak saptandığı bildirilmiştir.

Sunulan bu çalışmada, Verigene System mikroarray testi ile konvansiyonel kan kültürü sonrasında yapılan MALDI TOF MS identifikasyon sonuçları arasında 34/39 uyum saptanmıştır. Kültür sonrası MALDI TOF ile tanımlama yöntemi altın standart olarak değerlendirildiğinde mikroarray testinin duyarlılığı %87.1 olarak hesaplanmıştır. Araştırmanın ilk başladığı dönemde alınan iki "NO\_CALL" hatasının deneyim eksikliğine bağlı kullanıcı hatası kaynaklı olabileceği yorumu yapılmıştır, 33 No.lu kan kültürü şişesinde alınan "NO\_CALL" hatasının nedeni ise belirlenemmiştir.

Verigene System BC-GN iki saat içerisinde sonuç vermesi, kullanım kolaylığı, aynı şişede birden fazla etkeni yakalayabilmesi, direnç geni saptayarak klinisyene ESBL üretimi ve karbapenem direnci bilgisi verilebilmesi, antibiyotik inhibitörlü şişelerle çalışabilme ve yüksek duyarlılık gibi avantajlara sahiptir<sup>(16,17)</sup>. Bu sistemin dezavantajları, hasta başı maliyetlerinin yüksek olması, laboratuvarında ek alana gereksinim duyulması, saptayabildiği patojenlerin ve direnç genleri için mevcut veri tabanının kısıtlı olmasıdır. Bu çalışmada saptanan verilere dayanarak, Verigene System BC-GN mikroarray platformunun bakteriyemili hastalar için iki saat içerisinde yüksek doğrulukta bakteri identifikasyonu sağladığı yorumu yapılabilir. Çalışmamızın sonuçlarında mikroarray testinden elde edilmiş direnç genlerinin varlığı bir diğer moleküler yöntemle verifiye edilememiştir.

Sonuç olarak, hem LFM yöntemi hem de mikroarray platformunun bakteriyemi tanı sürelerini kısaltmaları açısından yararlı olduğu düşünülmüştür. Mikroarray sisteminin pozitif sinyal alınmış inhibitör içeren veya içermeyen kan kültürü şişesinden üç saat içerisinde identifikasyon ve direnç geni bilgisi verebilmesi, kişiye bağımlı kullanım hatalarını en aza indirmesi, çoklu etkeni tanıyabilmesi gibi avantajlarının yanında, saptayabildiği etken sayısının ve direnç geninin kısıtlı olması ve maliyet yüksekliği gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Lizis filtrasyonunun 15 dakika içerisinde çok daha geniş veritabanında identifikasyon yapabilmesi, mikroarray testi ile benzer duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması, hasta başı maliyetinin çok daha düşük olması ve ek alana gereksinim duyulmaması gibi avantajları vardır. Dezavantaj olarak uygulama zorluğu, inhibitörlü şişeden sonuç verilememesi, testi yapanın deneyimine göre sonuçların değişebilmesi ve direnç bilgisi eksikliği gösterilebilir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (31.07.2014 tarih ve 14-6/3 No.lu karar) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14-TIP-056 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Ege University Clinical Research Ethics Committee (07.31.2014/14-6/3).

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

**Funding:** Ege University, Scientific Research Committee (14-TIP-056).

## KAYNAKLAR

1. Doğanay M, Nozokomiyal sepsis: önemi ve tanımlar. *Hastane Enfeksiyon Derg.* 1998;2(4):179-81.
2. Perman SM, Goyal M, Gaieski DF. Initial emergency department diagnosis and management of adult patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012;20:41. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-20-41>
3. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):235-51. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-09>
4. Wojewoda CM, Sercia L, Navas M, et al. Evaluation of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2072-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00831-13>
5. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):805-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.02326-12>
6. Cohen J. A Coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20(1):37-46. <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-174.
8. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'homme G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):693-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-10>
9. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ.* 2003;326(7383):262-6. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7383.262>



10. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.  
<https://doi.org/10.4161/viru.27372>
11. Müderris T, Yurtsever SG, Baran N, et al. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin son beş yıldaki değişimi. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2019;76(3):231-42.  
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.65902>
12. Wüppenhorst N, Consoir C, Lörch D, Schneider C. Direct identification of bacteria from charcoal-containing blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(10):2843-50.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-012-1638-2>
13. Mancini N, Infurnari L, Ghidoli N, et al. Potential impact of a microarray-based nucleic acid assay for rapid detection of Gram-negative bacteria and resistance markers in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2014;52(4):1242-5.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00142-14>
14. Hill JT, Tran KD, Barton KL, Labreche MJ, Sharp SE. Evaluation of the nanosphere Verigene BC-GN assay for direct identification of gram-negative bacilli and antibiotic resistance markers from positive blood cultures and potential impact for more-rapid antibiotic interventions. *J Clin Microbiol*. 2014;52(10):3805-7.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01537-14>
15. Kim SY, Park JS, Hong YJ, et al. Microarray-based nucleic acid assay and MALDI-TOF MS analysis for the detection of Gram-negative bacteria in direct blood cultures. *Am J Clin Pathol*. 2019;151(2):143-53.  
<https://doi.org/10.1093/ajcp/aqy118>
16. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*. 2010;375(9710):224-30.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61569-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61569-5)
17. Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Evaluation of FilmArray and Verigene systems for rapid identification of positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3433-6.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01417-14>

# Karbapenem Dirençli *Enterobacterales* İzolatlarında Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden İlk KPC Bildirimi

## Investigation of Carbapenemase Genes in Carbapenem Resistant *Enterobacterales* Isolates: First KPC Report From Dokuz Eylul University Hospital

Şeyda Şilan Okalin\*<sup>Ⓞ</sup>, Ayşe Nur Sarı Kaygısız\*<sup>Ⓞ</sup>, Mahmut Cem Ergon\*\*<sup>Ⓞ</sup>, İbrahim Mehmet Ali Öktem\*\*<sup>Ⓞ</sup>

\* Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

\*\* Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

**Atf/Cite as:** Okalin ŞŞ, Sarı Kaygısız AN, Ergon MC, Öktem İMA. Karbapenem dirençli enterobacterales izolatlarında karbapenemaz genlerinin araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden ilk KPC bildirimi, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):375-81.

### Öz

**Amaç:** Son yıllarda *Enterobacterales* bakterileri arasında artan karbapenem direnci tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır. Bu direncin temel mekanizması karbapenemaz enzimlerinin üretimidir. Bu çalışmanın amacı; hastanemizde yatan hastalardan izole edilen karbapenem dirençli *Enterobacterales* izolatlarının karbapenemaz gen çeşitliliğinin araştırılması ve KPC geni bulunan izolatların klonal ilişkilerinin değerlendirilmesidir.

**Yöntem:** Ocak 2019-Mart 2019 tarihleri arasında; idrar, kan, trakeal aspirat, yara ve balgam örneklerinden izole edilmiş olan ve karbapenem grubundaki antibiyotiklerden en az birine dirençli, 48 *Enterobacterales* izolatı çalışmaya dâhil edilmiştir. *Enterobacterales* izolatlarının; üçü *Escherichia coli* ve 45'i *Klebsiella pneumoniae*'dir. Bu izolatlarda; OXA-48, NDM, KPC, IMP ve VIM karbapenemaz gen varlığı özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir tepkimesi yöntemi ile araştırılmıştır. KPC geni taşıyan *K. pneumoniae* izolatları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla PFGE yöntemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma bulgularına göre üç *E. coli* izolatının ikisi blaOXA-48, biri blaKPC pozitif olarak tanımlanmıştır. Kırk beş *K. pneumoniae* izolatının ise 30'u yalnızca blaOXA-48, ikisi yalnızca blaNDM pozitif olarak bulunmuştur. *K. pneumoniae* izolatının yedisinde hem OXA-48 hem de NDM genleri tanımlanırken, geriye kalan altı *K. pneumoniae* izolatında yalnızca KPC gen pozitifliği bulunmuştur. IMP ve VIM karbapenemaz genleri çalışma izolatlarının hiçbirinde saptanmamıştır. KPC geni taşıyan *K. pneumoniae* izolatları arasındaki klonal ilişkinin araştırılması amacıyla yapılan PFGE analizinde dört izolatın aynı pulsotipe (A), diğer iki izolatın ise farklı pulsotiplere (B-C) ait olduğu görülmüştür.

**Sonuç:** Bu çalışma, yapılan literatür taramasından elde edilen verilere göre KPC karbapenemaz geninin, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden bildirildiği ilk çalışmadır.

**Anahtar kelimeler:** Karbapenemaz, *Enterobacterales*, KPC

### ABSTRACT

**Objective:** In recent years, increasing carbapenem resistance of *Enterobacterales* bacteria limits treatment options, considerably. The main mechanism of this resistance is the production of carbapenemase enzymes. The aim of this study is to determine carbapenemase gene types in *Enterobacterales* isolates from our hospitalized patients and assess the clonal associations of the isolates with KPC gene.

**Method:** A total of 48 clinical *Enterobacterales* isolates resistant to at least one carbapenem and received between January 2019 and March 2019 were included in the study. Sample types were consisted of urine, blood, tracheal aspirate, wound and sputum. Of these isolates, three were *Escherichia coli* while 45 were *Klebsiella pneumoniae*. Types of carbapenemases were investigated by polymerase chain reaction, using specific primers for VIM, IMP, NDM, KPC and OXA-48 genes. PFGE was performed to determine the clonal associations between blaKPC positive *K. pneumoniae* isolates.

**Results:** According to the results, blaOXA-48 (n=2) and blaKPC (n=1) were found to be present among *E. coli* isolates. Regarding 45 *K. pneumoniae* isolates; only blaOXA-48 and only blaNDM were present in 30 and two isolates, respectively. Seven *K. pneumoniae* isolates were found positive for both blaOXA-48 and blaNDM. Remaining *K. pneumoniae* isolates (n=6) harboured only blaKPC. None of the isolates were positive for blaIMP and blaVIM. PFGE analysis showed four isolates had the same pulsotype (A), while two had different pulsotypes (B-C).

**Conclusion:** To our knowledge, this is the first report of KPC gene isolated in Dokuz Eylul University Hospital.

**Keywords:** Carbapenemase, *Enterobacterales*, KPC

**Alındığı tarih / Received:**  
21.06.2021 / 21.June.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
27.07.2021 / 27.July.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

Ş.Ş. Okalin 0000-0002-4249-8113  
A.N. Sarı Kaygısız 0000-0002-3927-9921  
M.C. Ergon 0000-0002-4847-987X  
İ.M.A. Öktem 0000-0002-3185-8355

✉ ali.oktem@deu.edu.tr

## GİRİŞ

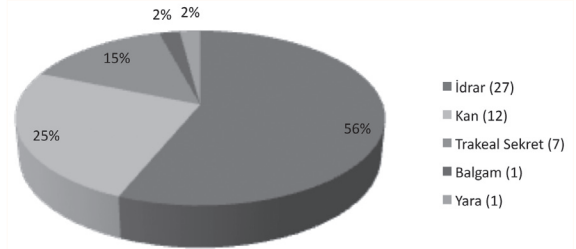
Gram negatif basil morfolojisindeki *Enterobacteriales* ailesi üyeleri kalın bağırsak mikrobiyotasında bulunmakta ve yaygın olarak insanda enfeksiyon etkeni olarak gözlenmektedir. Hem toplum kaynaklı hem de sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara neden olan *Enterobacteriales* ailesi; idrar yolu enfeksiyonlarına, kan dolaşımı enfeksiyonlarına, pnömoniye, menenjitte ve tıbbi cihaz kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilmektedir<sup>(1)</sup>. Son yıllarda geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz üreten *Enterobacteriales* enfeksiyonlarının tedavisinde, son seçenek olarak karbapenemlerin kullanılması, bu ilaç grubuna karşı da direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur<sup>(2,3)</sup>. Bu bakteriler horizontal gen aktarımı yoluyla (plazmid ve transpozon aracılıklı) genetik materyal ve dolayısıyla direnç genleri kazanma eğilimindedirler<sup>(1)</sup>. Bu nedenle gün geçtikçe karbapenemlere direnç artmakta, dirençle birlikte etkin tedavi seçenekleri kısıtlanmaktadır<sup>(2,3)</sup>.

Karbapenemlere karşı direnç genel olarak; enzim üretimi, atılım pompası kaynaklı ve/veya porin mutasyonu ile görülmektedir. Bunlar arasında, enzim üretimi en sık gözlenen direnç mekanizmasıdır. *Enterobacteriales* ailesinde görülen karbapenemazlar çeşitli sınıflara ait olabilirler. Bunlar Ambler sınıflandırmasına göre Sınıf A'dan *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC); Sınıf B'den New Delhi metallo- $\beta$ -laktamaz (NDM), "Imipenem-resistant" *Pseudomonas* (IMP) ve Verona "integron-encoded" metallo- $\beta$ -laktamaz (VIM); Sınıf D'den ise OXA-48-benzeri karbapenemazlar olarak gruplandırılmışlardır<sup>(4)</sup>. *Enterobacteriales* izolatlarındaki direnç oranları ve dirence neden olan karbapenemazlar bölgelere göre çeşitlilik göstermektedir<sup>(5)</sup>. Şimdiye kadar ülkemizde yapılan çalışmalarda, OXA-48, NDM, KPC, IMP, VIM tipi karbapenemazlar tanımlansa da en sık bildirilen karbapenemaz geni OXA-48 olmuştur<sup>(6-10)</sup>. Bu çalışmada amaç; hastanemizde yatan hastalardan izole edilen karbapeneme dirençli *Enterobacteriales* izolatlarının karbapenemaz gen çeşitliliğinin araştırılması ve KPC geni bulunan izolatların klonal ilişkilerinin değerlendirilmesidir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (02.12.2019 tarih ve 2019/29-34 karar No.) onaylanmıştır.

**İzolatlar:** Çalışmaya, Ocak 2019–Mart 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Hastanesi Bakterioloji laboratuvarına gelen; yatan hastalara ait idrar, kan, trakeal aspirat, yara ve balgam örneklerinden izole edilen, en az bir karbapeneme karşı dirençli toplam 48 *Enterobacteriales* izolatı (*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*) alınmıştır. İzolatların tanımlamasında geleneksel yöntemler ve VITEK-2 otomatize sistemi kullanılmış olup, antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Tek hasta tek izolat olacak şekilde alınan klinik örneklerin dağılımı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Klinik örnek dağılımı.

### Karbapenem Direnç Genlerinin Belirlenmesi:

İzolatlara ait karbapenemaz genleri (*bla*<sub>OXA-48-benzeri</sub>, *bla*<sub>NDM-benzeri</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> ve *bla*<sub>IMP</sub>) daha önce literatürde kullanılan ve Tablo 1'de belirtilen özgün primerler ile polimeraz zincir tepkimesi (PCR) yöntemiyle araştırılmıştır. Pozitif kontrol için daha önceden bu gen bölgeleri belirlenmiş ve sekans ile doğrulanmış izolatlar kullanılmıştır. PCR için %10 gliserol içeren Tryptic Soy Broth (TSB)'da -40°C'de saklanan izolatlar kanlı besiyerine ekilerek 37°C'de bir gecelik inkübas-yona bırakılmıştır. Kalıp DNA izolasyonu için 300  $\mu$ l steril distile su içerisinde birkaç saf koloni homojenize edilmiş ve 100°C'de 10 dakikalık kaynatma işleminden sonra 100 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR için tepkime karışımları toplam hacim 50 $\mu$ l olacak şekil-

**Tablo 1.** Karbapenemaz genlerinin belirlenmesinde kullanılan öncüller.

Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü	Tepkime Şartları	Referans
NDM-F:5'-CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' NDM-R:5'-ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'	826 bp	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1dk, denatürasyon 55°C→1 dk, birleşme 72°C→1,5 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	(11)
OXA-48-A:5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3' OXA-48-B:5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'	438 bp	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1dk, denatürasyon 53°C→1dk, birleşme 72°C→1 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	(12)
IMP-A: 5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' IMP-B: 5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3'	586 bp	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1dk, denatürasyon 57°C→1dk, birleşme 72°C→1 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	(13)
VIM-A: 5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' VIM-B: 5'-TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'	388 bp	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1dk, denatürasyon 57°C→1dk, birleşme 72°C→1 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	(13)
KPC-F: 5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3' KPC-R: 5'-TATTTTCCGAGATGGGTGAC-3'	331 bp	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1dk, denatürasyon 54°C→1dk, birleşme 72°C→1 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	(14)

de,  $bla_{OXA-48}$  öncüllerinden 25 pmol  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{IMP}$  öncüllerinden 20 pmol içerecek şekilde ve 5 µl kalıp DNA kullanılarak hazırlanmıştır. PCR yürütme koşulları Tablo 1'de belirtilen şekilde yapılmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek ürün büyüklükleri değerlendirilmiştir. İzolatlarda PCR ile belirlenen her bir farklı karbapenemaz gen bölgesi, doğrulama amacı ile dizi analize gönderilmiştir. DNA dizi analizi MacroGen firması (ABI 3730xl System) tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

**“Pulsed Field” Jel Elektroforezi (PFGE):** KPC geninin hastanemizdeki yayılımının klonal olup olmadığını anlamak üzere  $bla_{KPC}$  pozitif izolatlar PFGE uygulanmıştır. PFGE çalışması, PulseNet *Escherichia coli* protokolüne göre yapılmıştır<sup>(15)</sup>. Elde edilen jel görüntüsü Tenover kriterlerine göre analiz edilerek her bir izolat için pulsotip atanmıştır<sup>(16)</sup>.

## BULGULAR

Ocak 2019-Mart 2019 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve en az bir karbapenemaz dirençli bulunan 48 *Enterobacterales* izolatında (Üç *E. coli* ve 45 *K. pneumoniae* izolatı) araştırılan karbapenemaz genlerinin dağılımı şöyle bulunmuştur:

*E. coli* izolatlarının ikisi (%66.6)  $bla_{OXA-48}$  ve biri (%33.3)  $bla_{KPC}$  pozitifdir. 45 *K. pneumoniae* izolatının 30'u (%66.6) yalnızca  $bla_{OXA-48}$ , ikisi (%4) yalnızca  $bla_{NDM}$ , yedisi (%15.5) ise hem  $bla_{OXA-48}$  hem de  $bla_{NDM}$  pozitif olarak belirlenmiştir. Geriye kalan altı (%13.3) *K. pneumoniae* izolatında yalnızca  $bla_{KPC}$  pozitifliği bulunmuştur. *IMP* ve *VIM* karbapenemaz genleri hiçbir izolatta pozitif bulunmamıştır (Tablo 2). Aynı gen pozitifliğine sahip aynı tür izolatların antibiyogram paternleri çeşitlilik göstermektedir. *E. coli* izolatları için,  $bla_{OXA-48}$  pozitif izolat dağılımı çocuk hematoloji/onkoloji servisi (n=1) ve genel cerrahi servisi (n=1) şeklindedir.  $bla_{KPC}$  pozitif bulunan tek *E. coli* izolatı kök hücre nakil ünitesinden gönderilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında; yalnızca  $bla_{OXA-48}$  pozitif izolat dağılımı anestezi yoğun bakım (n=2), çocuk hastalıkları ve sağlığı servisi (n=1), çocuk hematoloji/

**Tablo 2.** Enterobacterales izolatlarının karbapenemaz dağılımı.

Karbapenemaz tipi	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Sayı (%)	<i>Escherichia coli</i> Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
OXA-48	30 (66.6)	2 (66.6)	32 (66.6)
NDM	2 (4.4)	0	2 (4.16)
OXA-48 + NDM	7 (15.5)	0	7 (14.5)
KPC	6 (13.3)	1 (33.3)	7 (14.5)
IMP	0	0	0
VIM	0	0	0
Toplam	45 (93.75)	3 (6.25)	48 (%100)

onkoloji servisi (n=1), dâhili yoğun bakım servisi (n=1), enfeksiyon servisi (n=1), gastroenteroloji servisi (n=1), genel cerrahi servisi (n=2), göğüs hastalıkları servisi (n=1), göğüs kalp damar yoğun bakım servisi (n=1), kardiyoloji servisi (n=2), kardiyoloji yoğun bakım (n=5), nefroloji servisi (n=5), onkoloji servisi (n=5), ortopedi servisi (n=1), üroloji servisi (n=3), sadece  $bla_{NDM}$  pozitif izolat dağılımı; hemoto-  
loji servisi (n=1) ve anestezi yoğun bakım (n=1) şek-  
lindedir. Hem  $bla_{OXA-48}$  hem de  $bla_{NDM}$  pozitif izolatlar;  
dâhili yoğun bakım servisi (n=3), nefroloji servisi  
(n=1), palyatif bakım servisi (n=1), göğüs hastalıkları  
servisi (n=1) ve onkoloji servisinden (n=1) gönderilir-  
ken,  $bla_{KPC}$  pozitif izolatlar; anestezi yoğun bakım  
(n=4), gastroenteroloji servisi (n=1) ve nöroşirurji  
servisinden (n=1) gönderilmiştir. Yapılan dizi analizinde,  
 $OXA-48$  karbapenemaz geninin  $bla_{OXA-48}$ ,  $NDM$   
karbapenemaz geninin  $bla_{NDM-1}$ ,  $KPC$  karbapenemaz  
geninin  $bla_{KPC-2}$  olduğu belirlenmiştir.  $KPC$  geni taşı-  
yan altı *K. pneumoniae* izolatı için yapılan PFGE ana-  
lizine göre üç farklı pulsotip (A-C) belirlenmiştir. Ocak  
ayında anestezi yoğun bakımdan izole edilen üç izo-  
lat ile gastroenteroloji servisinden izole edilen bir

izolatın aynı pulsotipte (A) olduğu görülmüştür. Anestezi yoğun bakımdan izole edilen diğer bir *K. pneumoniae* izolatı ile nöroşirurji servisinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatının farklı pulsotiplerde (B ve C) olduğu görülmüştür. PFGE görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir.

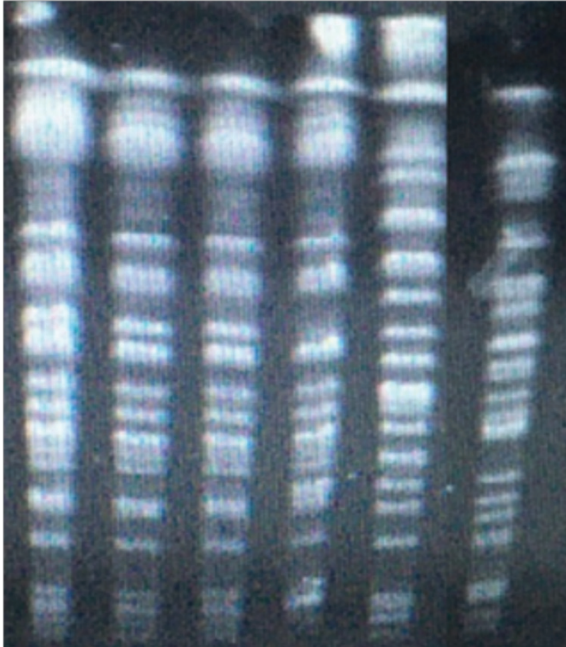
## TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç, bütün dünya ülkelerinde oldu-  
ğu gibi ülkemizde de ciddi bir sağlık sorunudur<sup>(17)</sup>. Çoklu dirence sahip *K. pneumoniae* izolatları, hasta-  
nelerde hızlı yayılım göstererek karbapenemaz gen-  
lerini hareketli genetik elemanlar yoluyla diğer Gram  
negatif bakterilere de aktarmaktadır<sup>(10)</sup>. Özellikle has-  
tane enfeksiyon etkeni olarak görülen *Enterobacterales*  
bakterilerinde hızlı yayılım ve aktarım sonucu artan  
karbapenem direnci, salgınlara, uzun hastane yatışla-  
rına ve mortaliteye neden olmaktadır<sup>(10,17)</sup>. Farklı  
hastanelerde yatış, yoğun bakım ünitelerinde uzun  
sürelili kalma, katater kullanımı, antibiyotik kullanımı  
ve altta yatan hastalıklar karbapenem direnci için risk  
faktörlerini oluşturmaktadır<sup>(18-20)</sup>.

Türkiye'de 2000-2003 yılları arası izole edilen izolat-  
larla yapılan antimikrobiyal direnç araştırması (MYSTIC) imipenem ve meropenem Gram  
negatif bakteri enfeksiyonlarında kullanılacak en  
etkili ilaçlar olduğu belirtilmiş ve izolatların çoğun-  
lukla meropenem ve imipeneme duyarlı olduğu  
gösterilmiştir<sup>(21)</sup>. Bununla beraber, 2007 yılında, has-  
tane izolatı olan Gram negatif bakteriler ile yapılan  
antimikrobiyal araştırması (HITIT-2) çalışmasında imi-  
penem dirençli *K. pneumoniae* izolatları tanımlan-  
mış ve karbapenem dirençli izolatların ortaya çıktığı  
ve hızla artış göstereceği vurgulanmıştır<sup>(22)</sup>. Daha  
sonra yapılan çalışmalarda da karbapenem dirençli  
izolat sayısında artış olduğu gösterilmiştir<sup>(5-10)</sup>.

Karbapenem direncine neden olan karbapenemaz  
genleri, farklı tarih ve bölgelerde, farklı bakterilerde  
ortaya çıkmıştır. İlk MBL çevrede bulunan ve fırsatçı  
olan *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* ve *Stenotrophomonas maltophilia* bakterilerinden izole  
edilmiştir. IMP-1; ilk defa *Serratia marcescens* bakte-  
risinde 1991 yılında Japonya'da tanımlanmıştır. Daha

A A A A B C



Şekil 2.  $KPC$  geni taşıyan *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının PFGE görüntüsü.

sonra 33 IMP varyantı gösterilmiş ve IMP tipi karbapenemazlar dünyanın birçok bölgesinde görülmeye başlanmıştır. IMP tipi enzimler Tayvan'da, Japonya'da ve Çin'in doğusunda endemik olarak rapor edilmektedir. MBL ailesinin diğer bir geni olan VIM-1 ilk defa 1997 yılında İtalya'da tanımlanmıştır. Kısa bir süre sonra varyantı olan VIM-2, Fransa'da *Pseudomonas aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. VIM-2 dünya çapında en çok rapor edilen MBL'dir ve Güney Avrupa ile Güneydoğu Asya'da endemik olarak tanımlanmaktadır<sup>(20)</sup>. NDM-1 ise ilk defa 2008 yılında daha önce Hindistan'da New Dehli'de yatan ve İsveç'e gelen bir hastadan izole edilmiştir<sup>(1)</sup>. Sıklıkla Birleşik Krallık, Hindistan ve Pakistan'da görülse de yapılan çalışmalarda, dünyanın birçok yerinde NDM-1 varlığı gösterilmiştir. Diğer bir karbapenemaz geni olan KPC, ilk defa 1996 yılında bir *K. pneumoniae* izolatında ABD'de tanımlanmıştır<sup>(2)</sup>. Kuzeydoğu Amerika'da endemik olan KPC karbapenemaz geni<sup>(17)</sup> birkaç yıl içinde Yunanistan, İsrail ve Çin gibi ülkelerde de gösterilmiş ve yapılan birçok çalışmada, KPC geni taşıyan izolatlar ile ilgili salgınlar rapor edilmiştir<sup>(1,20,23,24)</sup>. Türkiye'de ilk defa 2003 yılında *K. pneumoniae* bakterisinden izole edilen OXA-48, daha sonra hastane enfeksiyon salgınlarının kaynağı olarak yaygın bir şekilde görülmeye başlanmış ve güncel yayınlarda da en sık görülen karbapenemaz geni olma özelliğini taşıdığı gösterilmiştir<sup>(12,25)</sup>. OXA-48 geni, ilk tanımlamadan sonra Avrupa'nın bazı ülkelerinde, Afrika'da, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Kanada da rapor edilmiştir<sup>(1)</sup>. Türkiye'de endemik olarak görülen OXA-48 daha sonra yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir<sup>(5-10,18,19,25)</sup>. Bütün bu karbapenemaz genlerinin tanımlanması ve yayılmasından sonra; karbapenemaz üreten *Enterobacterales* izolatlarının, diğer karbapenem dirençli *Enterobacterales* izolatlarına göre virülansının yüksek olduğu ve artan mortalite ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur<sup>(26)</sup>. Mortalite ile ilişkilendirilen karbapenemaz genlerinin bu hızlı yayılımı göz önüne alındığında, karbapenem dirençli izolatların moleküler tayini daha da önem kazanmaktadır. Çalışmamızda, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında; OXA-48, NDM, KPC, IMP ve VIM direnç genleri araştırılmıştır. Ülkemizde endemik olan OXA-48 karbapenemaz geni, çalışma sonuçlarımız ile benzer olarak yapılan birçok çalışmada<sup>(5-</sup>

10,18,19,27). *Enterobacterales* izolatlarında en çok tanımlanan gen olmuştur. Türkiye'de *bla*<sub>NDM</sub> ilk defa 2011 yılında genç bir hastanın kan kültüründen izole edilen *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır<sup>(28)</sup>. Daha sonra yapılan çalışmalarda, Türkiye'de en çok izole edilen ikinci karbapenemaz geni durumuna gelmiştir<sup>(5,7,10,18,27)</sup>. Çalışmamızda da OXA-48 geninden sonra en çok tanımlanan karbapenemaz geni NDM'dir. Ülkemizde IMP tipi karbapenemaz ilk defa 2003 yılında, VIM tipi karbapenemazlar ise 2005 yılında *Enterobacter cloacae* izolatlarında tanımlanmıştır<sup>(29,30)</sup>. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise IMP ve VIM geni taşıyan az sayıda bakteri tanımlanmıştır<sup>(7,10,18)</sup>. Çalışmamızda ise, yapılan bazı araştırmalara benzer olarak<sup>(5,8,19)</sup> izole edilen *Enterobacterales* izolatlarında IMP ve VIM genleri tanımlanmamıştır.

*bla*<sub>KPC</sub> ülkemizde ilk defa 2012 yılında Romanya'dan gelen bir kadın hastanın endotrakeal aspirat örneğinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatında gösterilmiştir<sup>(31)</sup>. Daha sonra 2013 yılında karbapenem dirençli 22 *Enterobacterales* izolatı ile yapılan çalışmada, iki *K. pneumoniae* izolatında KPC geni tanımlanmıştır<sup>(9)</sup>. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde, Mart 2011–Mayıs 2012 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 24 karbapenem dirençli *E. coli* izolatının ikisinde KPC geni tanımlanmıştır<sup>(8)</sup>. Ege bölgesinde bulunan 11 merkezden alınan toplam 164 *Enterobacterales* üyesinde karbapenem genleri araştırılmış ve Afyon Kocatepe Üniversitesi'nden gönderilen aynı hastaya ait iki izolatta KPC geni tanımlanmıştır<sup>(32)</sup>. Yapılan birçok çalışmada ise, KPC karbapenemaz geni bildirilmemiştir<sup>(5-7,18)</sup>. Yine 2014 yılında, 18 merkezden toplanan karbapenem dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları ile yapılan çalışmada, KPC geni hiçbir izolatta görülmemiştir<sup>(3)</sup>. 2019 yılında yapılan çok merkezli diğer bir çalışmada ise karbapenem dirençli izolatların %16'sında yalnızca KPC genini, %2.8'inin ise hem NDM hem de KPC genlerini taşıdığı gözlenmiştir<sup>(25)</sup>. Çalışmamızda ise, 48 *Enterobacterales* bakterisinin %14.7'sinde KPC geni belirlenmiştir. Geriye yönelik yapılan PCR çalışmasına göre, *bla*<sub>KPC</sub> hastanemizde ilk defa 15 Eylül 2018 tarihinde yatan bir hastanın kan kültüründen izole edilen *K. pneumoniae* izolatında ortaya çıktığı görülmüştür.

PFGE analizine göre, aynı klona ait üç *K. pneumoniae* izolatının yakın tarihlerde anestezi yoğun bakımda yatan hastalardan izole edildiği görülmüştür. Takip eden aylarda KPC geninin farklı klonlar arasında ve başka servislere yatan hastalar arasında yatay geçiş ile yayıldığı düşünülmektedir.

Salgınlara neden olan karbapenem dirençli *Enterobacterales* izolatları sağlık açısından ciddi tehdit oluşturmaktadır. Bu izolatların takibi karbapenemaz genlerinin yayılımının engellenmesi ve hastane salgınlarının önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızla KPC geni hastanemizden ilk kez bildirilmiştir. Özellikle bu tür direnç genlerinin yayılımında horizontal geçiş riskinin olması İzmir'deki hastanelerde ortak klonların ortaya çıkması olasılığını kuvvetlendirmektedir. Bu nedenle KPC geni taşıyan izolatlarla karşı hastanelerdeki ilgili birimlerin dikkatli olması önerilmektedir.

**Etik Kurulu Onayı:** Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (02.12.2019 tarih ve 2019/29-34 karar No.) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Dokuz Eylul University, Noninvasive Research Ethics Committee (12.02.2019/2019/29-34).

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

## KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-8. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
2. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(4):228-36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
3. Çakar A, Akyön Y, Gür D ve ark. Türkiye'de 2014 yılı içinde izole edilen karbapenem dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(1):21-33. <https://doi.org/10.5578/mb.10695>
4. Suay-García B, and Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections. *Antibiotics*. 2019;8(3):122. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030122>
5. Sahin K, Tekin A, Ozdas S, et al. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:44. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0105-1>
6. Çiftçi İH, Karakeçe E, Aşık G, Demiray T, Er H. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında OXA-48 ve KPC varlığının araştırılması. *ANKEM Derg*. 2013;27(2):49-54. <https://doi.org/10.5222/ankem.2013.049>
7. Davarci I, Senbayrak S, Aksaray S, Kocoglu ME, Kuskucu MA, Samasti M. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Anadolu Klin*. 2019;24(1):1-7. <https://doi.org/10.21673/anadoluklin.423081>
8. Kuskucu MA, Karakullukcu A, Ailiken M, Otlu B, Mete B, Aygun G. Investigation of carbapenem resistance and the first identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme among *Escherichia coli* isolates in Turkey: A prospective study. *Travel Med Infect Dis*. 2016;14(6):572-6. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.11.006>
9. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, et al. Spread of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2929-33. <https://doi.org/10.1128/AAC.02047-13>
10. Alp E, Perçin D, Colakoğlu S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect*. 2013;84(2):178-80. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.03.002>
11. Samuelsen Ø, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Norway. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):670-2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq483>
12. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>
13. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol*.

- 2005;43(7):3129-35.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005>
14. Kamel NA, El-tayeb WN, El-Ansary MR, Mansour MT, Aboshanab KM. Phenotypic screening and molecular characterization of carbapenemase producing Gram-negative bacilli recovered from febrile neutropenic pediatric cancer patients in Egypt. *PLoS One*. 2018;13(8):1-12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202119>
  15. CDC. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Center for Disease Control and Prevention, 2017. [<https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>] (Erişim tarihi:10.Haziran.2020)
  16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
  17. Lutgring JD. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: An emerging bacterial threat. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(3):182-6.  
<https://doi.org/10.1053/j.semmp.2019.04.011>
  18. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:20.  
<https://doi.org/10.1186/s12941-016-0136-2>
  19. Cetinkol Y, Yildirim AA, Telli M, Calgin MK. The investigation of oxacillinase/ metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infez Med*. 2016;24(1):48-53.
  20. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends Mol Med*. 2012;18(5):263-72.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
  21. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000–2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(4):453-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.016>
  22. Gur D, Hascelik G, Aydin N, et al. Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. *J Chemother*. 2009;21(4):383-9.  
<https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.4.383>
  23. Hong SK, Yong D, Kim K, et al. First outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in a hospital in South Korea. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3877-9.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01730-13>
  24. Chi X, Hu G, Xu H, et al. Genomic analysis of A KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 outbreak from a teaching hospital in Shandong Province, China. *Infect Drug Resist*. 2019;12:2961-9.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S221788>
  25. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z ve ark. Türkiye’de 2019 yılı içinde izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz epidemiyolojisi. *Mikrobiyol Bul*. 2021;55(1):1-16.  
<https://doi.org/10.5578/mb.20124>
  26. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, et al. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2017;64(3):257-64.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw741>
  27. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir SŞ, Hoşgör Limoncu M. Klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bul*. 2017;51(3):269-76.  
<https://doi.org/10.5578/mb.57333>
  28. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoglu S, Ozer UG, and Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2784-5.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00150-12>
  29. Gacar GG, Midilli K, Kolaylı F, et al. Genetic and enzymatic properties of metallo-lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4400-3.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4400-4403.2005>
  30. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(7):695-6.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01480.x>
  31. Labarca J, Poirel L, Özdamar M, Turkoglu S, Hakkı E, and Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect*. 2014;2(2):50-1.  
<https://doi.org/10.1002/nmi2.42>
  32. Telli M, Uçal S, Biçmen M ve ark. Ege bölgesi hastanelerinden elde edilen karbapenem dirençli enterik bakterilerde karbapenemaz direnç genlerinin araştırılması. 12. Antimikrobiyal Kemoterapi Günleri, 01-03 Nisan 2016, İstanbul; 2016: TPS-90.



# Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Yatan Hasta Kümülatif Antibiyotik Duyarlılık Raporu (2020)

## Inpatient Cumulative Antibiotic Susceptibility Report of Afyonkarahisar Health Sciences University Research and Practice Hospital (2020)

Melihat Gürbüz <sup>1</sup>, Emek Türkekel Şen <sup>1</sup>, Cengiz Demir <sup>1</sup>, Berrin Esen <sup>1</sup>

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

**Atf/Cite as:** Gürbüz M, Türkekel Şen E, Demir C, Esen B. Afyonkarahisar sağlık bilimleri üniversitesi sağlık uygulama ve araştırma merkezi yatan hasta kümülatif antibiyotik duyarlılık raporu (2020), Türk Mikrobiyol Cemiyet Derg. 2021;51(4):382-92.

### Öz

**Amaç:** Kümülatif antibiyotik duyarlılık raporları, ampirik tedavinin doğru seçilmesine ve antibiyotik direnciyle mücadele politikalarının geliştirilmesine rehberlik edebilir. Bu çalışmada, hastanemizde yatan hastalara ait klinik örneklerden izole edilen gram negatif ve gram pozitif etkenler için bir yıllık kümülatif antibiyotik duyarlılık raporunun hazırlanması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bakterilerin tanımlaması ve antibiyotik duyarlılıkları otomatize VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) sistemi ile test edilmiş ve antibiyogram sonuçları The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021) önerilerine göre değerlendirilmiştir. Kümülatif antibiyotik duyarlılık raporu, Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data (CLSI 2014, M39-A4) rehberinde yer alan kriterlere göre hazırlanmıştır.

**Bulgular:** Bu çalışmaya 1.490 izolat dahil edilmiştir. Gram pozitif bakterilere en etkili antibiyotikler vankomisin, teikoplanin, linezolid ve tigesiklin olmuştur. Bu antibiyotiklere ek olarak tetrasiklin de *Enterococcus* spp. izolatlarında etkili bulunmuştur. Enterik bakterilerden *Escherichia coli* izolatlarında tigesiklin ve sefuroksim etkili iken, üriner enterik *E. coli* izolatlarında nitrofurantoin ve meropenem ampirik tedavide kullanılabileceği tespit edilmiştir. *Proteus mirabilis*'e karşı en etkili antibiyotiklerin meropenem ve amikasin olduğu görülmüştür. Enterik ve üriner enterik bakteriler içerisinde *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında ampirik tedavide tercih edilecek hiçbir antibiyotik seçeneğinin kalmadığı tespit edilmiştir. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında en etkili antibiyotiğin tigesiklin, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında ise en etkili antibiyotiğin tobramisin olduğu belirlenmiştir.

**Sonuç:** Gram negatif ve gram pozitif bakteriler için ampirik tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır ve kümülatif antibiyotik raporlarının yakından izlenmesinin antibiyotik direnç oranlarını iyileştirip azaltacağına inanılır.

**Ahahtar kelimeler:** Kümülatif antibiyogram, enterik bakteriler, nonfermentatif bakteriler

### ABSTRACT

**Objective:** Broad-spectrum antibiotics used in empirical treatment lead to an increase in multidrug-resistant bacteria in intensive care units and hospital wards. Cumulative antibiotic susceptibility reports can guide the correct selection of empirical therapy and development of antibiotic resistance policies. In this study, we aimed to prepare a one-year inpatient cumulative antibiotic susceptibility report for our hospital.

**Method:** Identification of bacteria and antibiotic susceptibility tests were performed with the automated VITEK 2 (bioMérieux, France) system and antibiogram results were evaluated according to the recommendations of The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021). The cumulative antibiotic susceptibility report has been prepared according to the criteria in the Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data (CLSI 2014, M39-A4).

**Results:** In this study, 1490 isolates were analysed. Vancomycin, teicoplanin, linezolid, and tigecycline were effective against gram positive agents. While tigecycline and cefuroxime were effective against enteric *Escherichia coli* isolates, nitrofurantoin and meropenem can be used in empirical treatment in urinary enterics. It has been observed that the most effective antibiotics against *Proteus mirabilis* were meropenem and amikacin. It was found that among the enteric and urinary enteric bacteria, there was no antibiotic option to be preferred in empirical treatment against *Klebsiella pneumoniae* isolates. Tigecycline was the most effective antibiotic against *Acinetobacter baumannii* isolates, whereas tobramycin was the most effective antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

**Conclusion:** Empirical treatment options for gram-negative and gram-positive bacteria are limited, and we believe that close monitoring of cumulative antibiotic reports will improve and reduce antibiotic resistance rates.

**Keywords:** Cumulative antibiogram, enteric bacteria, nonfermentative bacteria

**Alındığı tarih / Received:**  
31.05.2021 / 31.May.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
27.07.2021 / 27.July.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

M. Gürbüz 0000-0001-6290-1216  
E. Türkekel Şen 0000-0002-4328-7190  
C. Demir 0000-0002-5569-886X  
B. Esen 0000-0003-1590-7150

✉ drmelahatgrbz@hotmail.com

## GİRİŞ

Dünya çapında antimikrobiyal direncin artmakta olduğu bu dönemde, antibiyotiklerin akılcı kullanımı ve antimikrobiyal direnç sürveyansı her geçen gün daha da önem kazanmaktadır<sup>(1)</sup>.

Antibiyotik direnç oranları zamana bağlı ve bölgesel olarak değişiklik gösterir. Klinikte sıklıkla izole edilen mikroorganizmalara yönelik ampirik tedavinin belirlenebilmesi, mortalite ve morbiditenin azaltılabilmesi için birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarı düzenli olarak kümülatif antimikrobiyal duyarlılık testi verilerini yayınlamaktadır<sup>(2)</sup>.

Kümülatif antibiyogram sonuçları, hastaya ait kültür sonuçlarının çıkmadığı dönemde uygunsuz ve etkili olmayan antibiyotik kullanımının önüne geçerken aynı zamanda geniş spektrumlu antibiyotiklerin gereksiz kullanımını da önler. Buna ek olarak kurumlar arasında antimikrobiyal direnç oranlarının karşılaştırılabilmesine olanak sağlar. Kümülatif antimikrobiyal duyarlılık testlerine ait raporlar, kurum içinde zamanla gelişen direnç eğilimlerinin izlenmesi ve antibiyotik kullanımına ilişkin düzenlemelerin yapılmasında da yol göstericidir. Kümülatif antibiyogram verilerinin analizi ve raporlandırılması uygun ampirik tedavi seçiminde ve antibiyotik direncinin önlenmesinde önemli yer tutmaktadır. Her hastanenin düzenli olarak kendi verilerini değerlendirmesinin, ampirik tedaviye başlamada, kültür ve antibiyogram sonucuyla tedaviyi düzenlemede ve antibiyotik direncini önlemede kilit rol aldığı bildirilmektedir<sup>(3-6)</sup>.

Bu çalışmanın amacı, hastanemizde yatmakta olan hastaların mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş olan çeşitli klinik örneklerinden izole edilen bakterilerin kümülatif antimikrobiyal duyarlılık verilerini değerlendirmek ve bu veriler ile hastanemize ait antibiyotik yönetimi politikalarına ve klinisyenlerin ampirik tedavi seçimine katkıda bulunmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafın-

dan (04.12.2020 tarih ve 2011-KAEK-2 kod no) onaylanmıştır.

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.01.2020–31.12.2020 tarihleri arasında çeşitli servis ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen 14.427 örneğin 2.961 (%20.5)'inde üreme saptanmıştır. Üremesi olan örneklerin 1.490 (%50.3)'ü retrospektif olarak incelenmiştir. Bir yıllık kümülatif antibiyogram verilerinin incelendiği hastanemiz, 640 yatakla hizmet vermektedir ve hastanenin hizmet ettiği toplam nüfus yaklaşık yedi yüz bindir.

Bakterilerin tanımlaması ve antibiyotik duyarlılıkları otomatize VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) sistemi ile test edilmiş ve antibiyogram sonuçları The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021) önerilerine göre değerlendirilmiştir<sup>(7)</sup>. Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE) suşları gradient test ile doğrulanmıştır.

Kümülatif antibiyotik duyarlılık raporu, "Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data (CLSI 2014, M39-A4)" rehberinde ve bunun ışığında hazırlanmış olan KLİMUD-Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Antibiyotik Duyarlılık Verilerinin Analizi ve Sunumu Rehberi'nde yer alan kriterlere göre hazırlanmıştır<sup>(8,9)</sup>. Rehberler doğrultusunda, her hastaya ait sadece son doğrulanmış test sonucu incelenmiş ve araştırmanın yapıldığı dönem içinde laboratuvarımızda 30 ve üzeri sayıda bakteri izolatu saptanan türler çalışma kapsamına alınmıştır. Tekrarlayan üremelerde sadece ilk izolatlar rapora dahil edilirken, tarama amaçlı toplanan örneklerden izole edilen suşlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmada, rutin olarak test edilen antibiyotiklere yer verilmiş ve bu antibiyotiklere ait sadece duyarlılık yüzdeleri bildirilmiştir. Rehberin önerisi doğrultusunda gram negatif izolatlar için gruplandırmalar enterik, üriner enterik ve nonfermentatif olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır. Buna göre 616 adet enterik ve üriner enterik gram negatif bakteri, 394 adet nonfermentatif gram negatif bakteri değerlendirmeye alınmıştır. KLİMUD/ "Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi, Kan Dolaşımı Örnekleri"ne<sup>(10)</sup>

göre etken olarak tanımlanmış 273 koagülaz negatif stafilokok (KNS) izolatının da aralarında olduğu toplam 480 adet gram pozitif bakteriye ait antibiyogram sonucu da değerlendirilmiştir.

**İstatistik analiz:** Çalışmanın istatistiksel analizi "IBM SPSS Statistics 20" programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde değerleri olarak ifade edilmiştir. Servis ve yoğun bakımdaki örnekler arasında incelenen bakteriye göre antibiyotik duyarlılıklarında fark olup olmadığı ki-kare testi ile araştırılmış ve p değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya toplam 326 *Escherichia coli*, 260 *Klebsiella pneumoniae*, 30 *Proteus mirabilis*, 165 *Pseudomonas aeruginosa*, 229 *Acinetobacter baumannii*, 99 *Staphylococcus aureus*, 46 *Enterococcus faecalis*, 32 *Enterococcus faecium* ve etken olarak tanımlanmış 273 koagülaz negatif stafilokok (KNS) izolatı dahil edilmiştir.

Bu çalışmaya dahil edilen gram pozitif bakteriler ara-

sında en sık izole edilen etken KNS'ler (n=273, %55.7) olurken ikinci en sık izole edilen patojenin *S. aureus* (n=99, %20.2) olduğu saptanmıştır. Servislerden ve yoğun bakımdan gönderilen klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarındaki metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) oranı sırasıyla %14.3 ve %27.8 olarak tespit edilmiştir. KLİMUD-Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Antibiyotik Duyarlılık Verilerinin Analizi ve Sunumu Rehberi'ne göre ampirik tedavi için kümülatif antibiyotik duyarlılık sınırı >%90 olarak kabul edilmiştir<sup>(9)</sup>. Bu rehberde göre çalışmamızda etken olarak tanımlanan *S. aureus*'un ampirik tedavisinde kullanılması en uygun olan antibiyotikler vankomisin, linezolid, forfomisin, teikoplanin ve tigesiklin olarak saptanmıştır. Etken olduğu tespit edilen KNS izolatları için sadece idrar dışı örnekler incelenmiş ve bu izolatlarda en yüksek duyarlılık oranı vankomisin, tigesiklin ve linezolid'de görülmüştür. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının ampirik tedavisinde en uygun antibiyotiklerin ise tigesiklin, vankomisin, linezolid ve tetrasiklin olduğu saptanmış ve bu izolatlardaki vankomisin direnç oranı ise *E. faecalis*'te %5.3 ve *E. faecium*'da %10 olarak belirlenmiştir (Tablo 1). Metisiline duyarlı ve dirençli stafilokoklarda diğer antibiyotiklere duyarlılık durumları

**Tablo 1. Gram pozitif bakterilere ait kümülatif antibiyotik duyarlılık oranları (%).**

Antibiyotik	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=99)		<i>Enterococcus faecalis</i> ** (n=46)		KNS*** (n=273)	
	Servis (n=63)	Yoğun Bakım (n=36)	Servis (n=46)	Servis (n=32)	Servis (n=159)	Yoğun Bakım (n=114)
Daptomisin	89.8	93.1	-	-	95.7	93.1
Ampisilin	.*	-	64.5	23.8	-	-
Benzil Penisilin	13.8	0	-	-	-	-
Siprofloksasin(#)	84	66.7	63.2	20	45.6	29.3
Klindamisin	69.4	70.6	-	-	50.6	33
Eritromisin	71.7	73.3	-	-	23.8	15.5
Fusidik Asit	94.5	85.7	-	-	22.4	14.7
Gentamisin	93.4	88.2	-	-	69	51.8
Gentamisin Yüksek Düzey	-	-	62.5	25	-	-
Linezolid	100	100	95.6	100	99.4	97.2
Teikoplanin	93	100	62.2	86.2	69.5	68.8
Tetrasiklin	90	87.9	91.7	100	80	76.9
Tigesiklin	95.5	94.1	100	100	100	97.6
Trimetoprim/Sulfametoksazol	95.8	83.3	42.9	26.3	76.7	71.4
Vankomisin	100	100	94.7	90	100	100

\* Test edilmeyen antibiyotik

\*\* Yoğun bakım ünitesinden izole edilen örnek sayısı 30'dan az.

\*\*\* Koagülaz negatif *Staphylococcus*; KLİMUD/"Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi. Kan Dolaşımı Örnekleri"ne<sup>(10)</sup> göre etken olarak tanımlanmış suşlar dahil edilmiştir.

(#) Stafilokoklarda verilen duyarlılık oranları I (Duyarlı, yüksek doz) verilerini içermektedir.

Tablo 2. Metisilin direncine göre *Staphylococcus* suşlarında antibiyotik duyarlılık oranları (%).

Antibiyotik	Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i> (n=80)		Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (n=19)		Metisilin Duyarlı KNS (n=158)		Metisilin Dirençli KNS (n=115)	
	Servis (n=54)	Yoğun Bakım* (n=26)	Servis* (n=9)	Yoğun Bakım* (n=10)	Servis (n=91)	Yoğun Bakım (n=67)	Servis (n=68)	Yoğun Bakım (n=47)
Daptomisin	90.9	90.9	80	100	95.1	88.7	96.6	100
Ampisilin	-.**	-	-	-	-	-	-	-
Benzil Penisilin	16	0	0	0	-	-	-	-
Siprofloksasin(#)	83.3	78.6	100	25	37.8	30	30.8	27.3
Klindamisin	73.6	75	44.4	60	52.2	34.9	48.5	30.4
Eritromisin	76.5	85.7	44.4	44.4	26.9	14	16.9	17.5
Fusidik Asit	95.9	88.2	83.3	75	23.2	20	21.1	0
Gentamisin	94.3	91.7	87.5	80	74.2	56.3	62.1	45.7
Gentamisin Yüksek Düzey	-	-	-	-	-	-	-	-
Linezolid	100	100	100	100	100	95.2	98.5	100
Teikoplanin	95.8	100	77.8	100	72.3	73.2	67.2	63.9
Tetrasiklin	90.2	91.3	88.9	80	71.1	68.3	91	89.1
Tigesiklin	95.2	100	100	75	100	100	100	90.9
Trimetoprim/Sulfametoksazol	95.7	85.7	100	75	78.7	64.5	69.2	90.9
Vankomisin	100	100	100	100	100	100	100	100

KNS: Koagülaz negatif *Staphylococcus*

\* Duyarlılık oranları 30'dan az izolat için hesaplanmıştır.

\*\* Test edilmeyen antibiyotik

(#): Verilen duyarlılık oranları I (Duyarlı, yüksek doz) verilerini içermektedir.

Tablo 3. Nonfermentatif bakterilere ait kümülatif antibiyotik duyarlılık oranları (%).

Antibiyotik	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=165)			<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=229)		
	Servis (n=101)	Yoğun Bakım (n=64)	p*	Servis (n=61)	Yoğun Bakım (n=168)	p
Amikasin	83	67.2	0.0192	42.6	28.1	0.0380
Sefepim(#)	68.9	53.6	0.1874	-.**	-	-
Seftazidim(#)	63.8	56.7	0.5296	-	-	-
Siprofloksasin(#)	81.9	62.5	0.0081	21.6	15.6	0.3331
Gentamisin	80	59.4	0.0041	23	16.9	0.2954
İmipenem(#)	71.8	38.9	0.0001	18.6	3.3	0.0008
Levofloksasin(#)	59.5	37.8	0.0217	13.9	1.9	0.0045
Meropenem	63	30.2	0.00004	20	3.6	0.00005
Netilmisin	63.5	37.8	0.4318	26.8	21.6	0.4895
Piperasilin	40.2	29.4	0.2059	-	-	-
Piperasilin/Tazobaktam(#)	70.2	33.3	0.0014	-	-	-
Tetrasiklin	-.**	-	-	-	-	-
Tigesiklin	-	-	-	68.2	81.8	0.1924
Tobramisin	83.9	81.8	0.8445	40	17.1	0.0828
Trimetoprim/Sulfametoksazol	-	-	-	12	12.9	0.9086

KNS: Koagülaz negatif *Staphylococcus*

\* Duyarlılık oranları 30'dan az izolat için hesaplanmıştır.

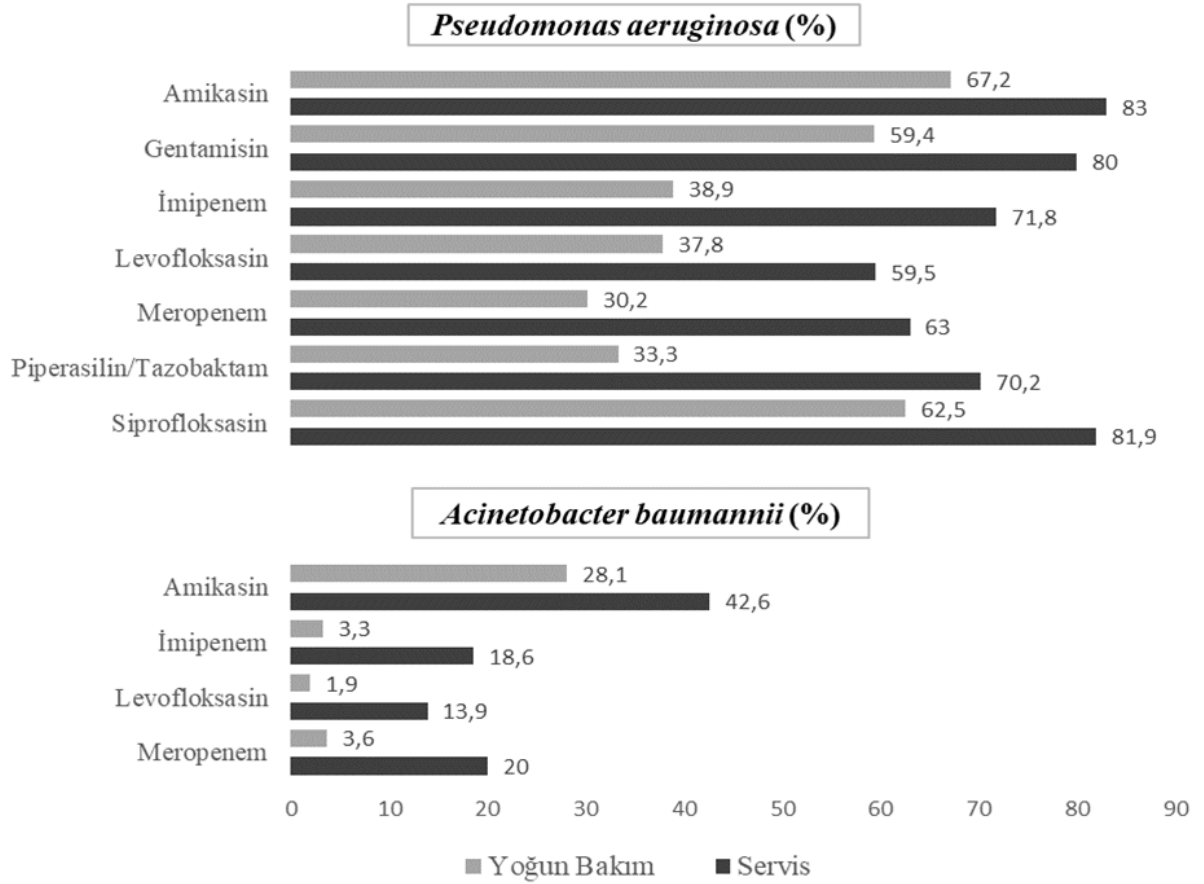
\*\* Test edilmeyen antibiyotik

(#): Verilen duyarlılık oranları I (Duyarlı, yüksek doz) verilerini içermektedir.

karşılaştırıldığında MRSA grubunda ampirik tedavide kullanılması en uygun antibiyotikler vankomisin, linezolid, teikoplanin ve tigesiklin olarak saptanmıştır. Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında ise bu antibiyotiklere ek olarak daptomisin ve tetrasiklinin de ampirik tedaviye uygun olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Çalışmamızda izole edilen gram pozitif bakterilerdeki antibiyotik duyarlılıkları yoğun bakım

ünitesi ve servisler arasında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.  $p < 0.05$  olan değerlerin anlamlı kabul edildiği istatistiksel analizde sadece KNS grubu bakterilerde klindamisin duyarlılığında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $p=0.004$ ).

Nonfermentatif gram negatif bakteriler arasında en sık *A. baumannii* izole edilmiştir (Tablo 1). Özellikle



Şekil 1. Nonfermentatif bakterilerde servis ve yoğun bakım hastalarından izole edilen suşlar arasındaki duyarlılık oranlarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı tespit edildiği antibiyotikler.

yoğun bakım ünitelerinde daha çok görülmekle birlikte en düşük duyarlılık oranı *A. baumannii* izolatlarında saptanmıştır. Yoğun bakımdan gönderilen klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* suşlarının karbapenem grubu antibiyotiklere duyarlılıkları %5'in altında bulunmuştur. Servis ve yoğun bakım örneklerinde bu türe en etkili antibiyotiğin tigesiklin (%68.2 ve %81.8) olduğu saptanmıştır. *P. aeruginosa* bu grupta ikinci en sık izole edilen tür olmuştur. Tüm yatan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında en etkili antibiyotiğin ise tobramisin (%83.9 ve %83.1) olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). *A. baumannii* için amikasin, levofloksasin ve karbapenem grubu antibiyotiklerin duyarlılığında, *P. aeruginosa* için ise amikasin ve gentamisin, karbapenem grubu antibiyotikler, levofloksasin, siprofloksasin ve piperasilin/tazobaktam duyarlılığında servis ve yoğun bakım suşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (Şekil 1).

Bu çalışmaya dahil edilen enterik (idrar dışı) bakteriler incelendiğinde *K. pneumoniae*'nın 2020 yılı içerisinde en sık izole edilen gram negatif tür olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). *K. pneumoniae* bu grup içerisinde antibiyotik duyarlılığı en düşük saptanan etkidir. Yoğun bakım ünitelerinde karbapenem duyarlılığı %30'un altına kadar düşmüştür. Servislerden gönderilen klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae*'ya karşı en etkili antibiyotiğin amikasin olduğu görülmüş, *K. pneumoniae* türlerinde ampirik tedavide tercih edilecek hiçbir antibiyotik seçeneğinin kalmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda servis ve yoğun bakımdan izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) oluşturan *K. pneumoniae* izolatlarının oranı ise sırasıyla %15.1 ve %18.6 olarak belirlenmiştir. Bu raporda yer alan enterik etkenler içerisinde ikinci sıklıkta izole edilen tür ise *E. coli* olmuştur. *E. coli*'nin ampirik tedavisinde kullanılacak en uygun antibiyotiklerin tigesiklin ve

Tablo 4. Enterik (idrar dışı) bakterilere ait kümülatif antibiyotik duyarlılık oranları (%).

Antibiyotik	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=165)			<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=229)			<i>Proteus mirabilis</i> *** (n=30)
	Servis (n=90)	Yoğun Bakım (n=31)	P*	Servis (n=53)	Yoğun Bakım (n=113)	p	Servis (n=30)
Amikasin	90	83.9	0.3575	67.9	50	0.0304	80
Amoksisilin/Klavulanik Asit	65.6	21.1	0.0003	45.5	15.1	0.005	57.9
Ampisilin	11.1	9.5	0.8453	-**	-	-	31.8
Sefazolin	7.7	0	0.8456	0	4.2	0.3376	16.7
Sefepim	40.6	27.8	0.3636	45.5	5.9	0.00005	71.4
Sefoksitin	54.5	29.6	0.0289	36.8	14	0.0038	63
Seftazidim	27.5	22.2	0.671	29.6	5.4	0.0022	-**
Seftriakson	31.3	18.5	0.2084	51.3	23.8	0.0024	44.4
Sefuroksim	90.9	93.3	0.7662	58.8	40.9	0.089	0
Siprofloksasin	40	30	0.4237	51.5	10	0.00001	44.4
Ertapenem	87	69.6	0.0815	67.7	20.6	0.00001	72.7
Gentamisin	64.8	67.7	0.0895	52.8	43.2	0.2495	51.7
Meropenem	91	80	0.1054	70.6	25.2	0.00001	83.3
Piperasilin/Tazobaktam	54.3	36.4	0.165	34.5	4.1	0.00003	45.5
Tigesiklin	100	100	0.5478	68.4	17.8	0.00008	0
Trimetoprim/Sulfametoksazol	45.9	43.8	0.8827	61.9	25.5	0.004	40

\* p değeri &lt; 0.05 olması anlamlı kabul edilmiştir.

\*\* Test edilmeyen antibiyotik

\*\*\* Yoğun bakım ünitesinden izole edilen örnek sayısı 30'dan az.

Tablo 5. Üriner enterik bakterilere ait kümülatif antibiyotik duyarlılık oranları (%).

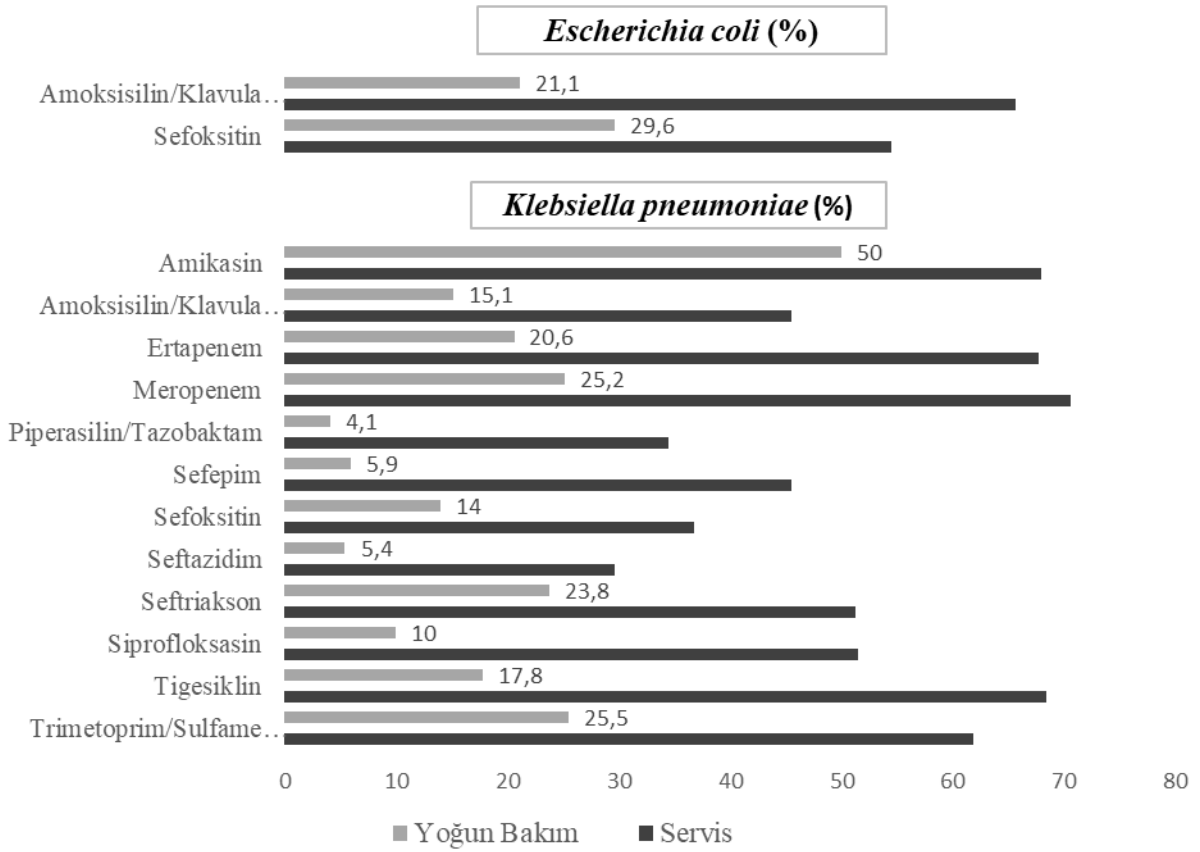
Antibiyotik	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=205)			<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=94)		
	Servis (n=166)	Yoğun Bakım (n=39)	P*	Servis (n=61)	Yoğun Bakım (n=33)	p
Amikasin	86.7	79.5	0.02483	75.4	33.3	0.00006
Amoksisilin/Klavulanik Asit	45.2	33.3	0.1931	31.5	11.1	0.045
Ampisilin	16.7	15.4	0.8461	-**	-	-
Sefiksim	54.2	62.2	0.3823	39.6	15.4	0.0295
Sefoksitin	55.7	61.2	0.4946	41.4	15.6	0.0123
Seftazidim	32.6	65.6	0.001	36.4	6.7	0.0318
Seftriakson	35.4	30.8	0.5824	35.1	25.8	0.3719
Siprofloksasin	38.8	43.8	0.7116	46.4	9.1	0.0287
Gentamisin	78.8	74.4	0.5485	70.5	30.3	0.0001
Ertapenem	93.9	89.7	0.3626	67.8	32.3	0.0012
İmipenem	94.3	89.5	0.2777	78	40	0.0003
Meropenem	94.5	89.7	0.2695	75.4	46.9	0.0059
Nitrofurantoin	96.1	89.5	0.1042	42.1	46.2	0.7299
Piperasilin/Tazobaktam	60.9	64.7	0.7691	50	15.4	0.0344
Trimetoprim/Sulfametoksazol	46.4	37.5	0.5105	53.6	18.2	0.0448

\* p değeri &lt; 0.05 olması anlamlı kabul edilmiştir.

\*\* Test edilmeyen antibiyotik

sefturoksim olduğu görülmüştür. Servis hastalarından izole edilen *E. coli* suşlarına karşı karbapenemlerin hala etkili olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* suşlarında GSBL oluşturma oranı servis hastalarında %75.6 iken yoğun bakım hastalarında %63.1'dir. *P. mirabilis*, çalışmada yer alan ve üçüncü sıklıkta izole edilen bakteri olmuştur ancak yoğun bakım ünitelerinden izole edilen suş sayısı 30'un altında kaldığı için sadece servislerden gönderilen örnekler rapora dahil edilmiştir. *P. mirabilis*'e karşı en etkili antibiyotiklerin

meropenem ve amikasin olduğu görülmüş ve *K. pneumoniae*'da olduğu gibi bu bakteri için de ampirik tedaviye uygun antibiyotik olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4). Servis ve yoğun bakım ünitelerinden izole edilen enterik bakteriler istatistiksel olarak incelendiğinde *E. coli* suşlarına ait antibiyotik duyarlılıkları arasındaki fark sadece amoksisilin/klavulanik asit ve sefoksitinde anlamlı bulunmuştur. *K. pneumoniae*'da ise sefazolin, sefturoksim ve gentamisin hariç duyarlılığı incelenen antibiyotiklerin tama-



Şekil 2. Enterik bakterilerde servis ve yoğun bakım hastalarından izole edilen suşlar arasındaki duyarlılık oranlarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı tespit edildiği antibiyotikler.

mında fark anlamlı olarak tespit edilmiştir (Şekil 2).

Üriner enterik bakterilere ait kümülatif antibiyotik duyarlılık oranları değerlendirildiğinde idrar örneklerinden en sık izole edilen etkenlerin sırasıyla *E. coli* ve *K. pneumoniae* olduğu görülmüştür (Tablo 5). İdrar kültürlerinden izole edilen etkenler incelendiğinde, antimikrobiyal duyarlılık oranı *K. pneumoniae* izolatlarında *E. coli* izolatlarına göre daha düşük bulunmuştur. Yoğun bakım hastalarından izole edilen *E. coli*'lerde karbapenem grubu antibiyotiklerde görülen duyarlılık oranı %89'ün üzerinde iken servis hastalarında %93'ün üzerinde bir duyarlılık saptanmıştır. *E. coli* suşlarında ampirik tedavi için en uygun antibiyotikler ise sırası ile nitrofurantoin ve meropenem olarak bulunmuştur. Bu rapora dahil edilen servis ve yoğun bakım hastaları değerlendirildiğinde üriner sistem örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında duyarlılığın oldukça düşük olduğu ve ampirik tedavide kullanılacak uygun bir antibiyotiğin

olmadığı görülmektedir (Tablo 5). Üriner enterik bakterilerdeki GSBL oranları *E. coli* ve *K. pneumoniae* için sırasıyla servis hastalarında %52.4 ve %37.7 yoğun bakım hastalarında ise %53.8 ve %33.3 olarak bulunmuştur. Servis ve yoğun bakımdan gönderilen hasta örneklerinden izole edilen üriner enterik bakterilere ait antibiyotik duyarlılıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, *E. coli*'de sadece seftazidimdeki fark anlamlı bulunmuştur ( $p=0.001$ ). *K. pneumoniae*'da ise seftriakson ve nitrofurantoin hariç duyarlılığı incelenen antibiyotiklerin tamamında anlamlı bir fark tespit edilmiştir (Şekil 3).

Karbapenem dirençli izolatlarda diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları incelendiğinde ise özellikle *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında duyarlılığın oldukça düşük olduğu ve birçok antibiyotiğin ampirik tedavide kullanılmalarının uygun olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 6).

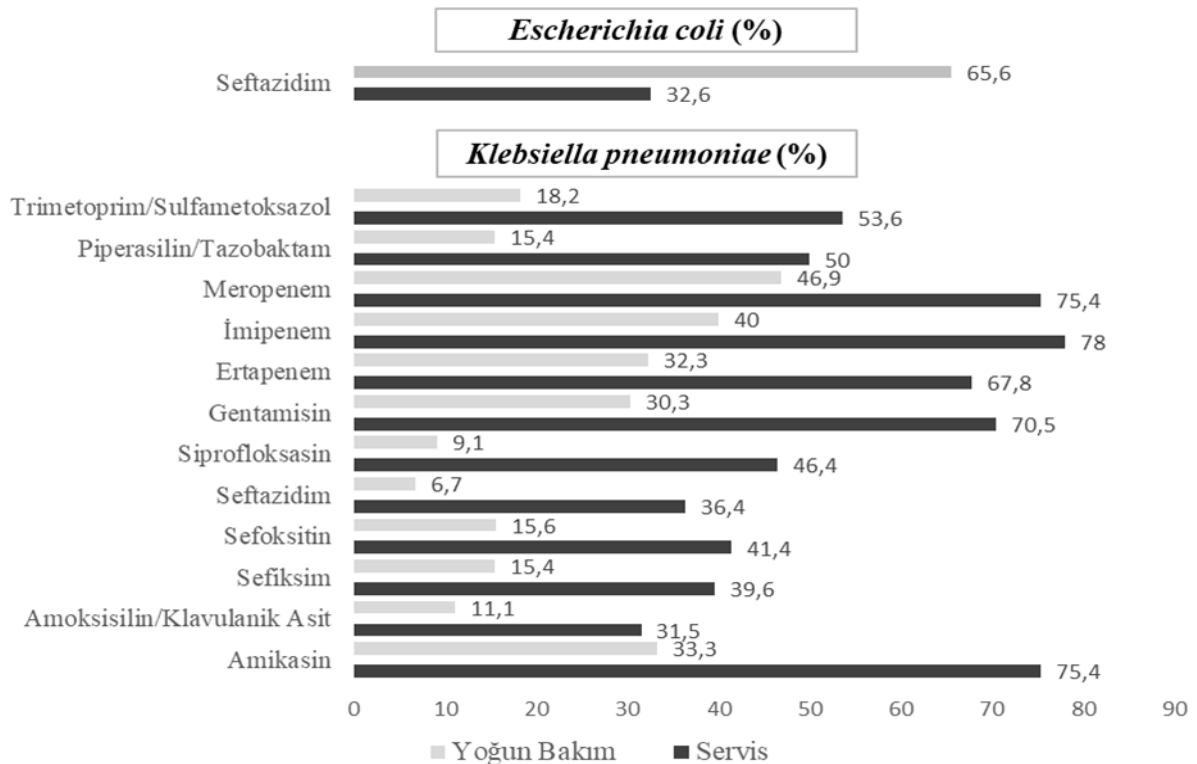
Tablo 6. Karbapenem dirençli izolatlarda antibiyotik duyarlılık oranları (%).

Antibiyotik	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Enterik) (n=98)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Üriner Enterik) (n=32)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=81)		<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=210)	
	Servis* (n=15)	Yoğun Bakım (n=83)	Servis* (n=15)	Yoğun Bakım* (n=17)	Servis (n=37)	Yoğun Bakım (n=44)	Servis (n=48)	Yoğun Bakım (n=162)
Amikasin	40	43.9	33.3	11.8	67.6	54.5	27.1	25.5
Amoksisilin/Klavulanik Asit	0	0	7.1	0	-	-	-	-
Ampisilin	-**	-	-	-	-	-	-	-
Gentamisin	26.7	35.8	53.3	11.8	59.5	43.2	6.3	14.4
Levofloksasin(#)	-	-	-	-	25.9	16.1	0	0
Netilmisin	-	-	-	-	44.4	19.4	11.8	20.2
Nitrofurantoin	-	-	-	-	-	-	-	-
Piperasilin	-	-	-	-	12.9	11.1	-	-
Piperasilin/Tazobaktam(#)	0	0	25	0	25	5.9	-	-
Sefazolin	0	0	0	0	-	-	-	-
Sefepim(#)	0	0	-	-	18.2	41.2	-	-
Sefiksim	-	-	-	-	-	-	-	-
Sefoksitin	0	0	0	0	-	-	-	-
Seftazidim(#)	0	0	0	0	18.2	47.1	-	-
Seftriakson	33.3	13.1	15.4	23.5	-	-	-	-
Sefuroksim	30	25	0	66.7	-	-	-	-
Siprofloksasin(#)	45.5	1.8	0	16.7	70.6	48.7	9.5	14.4
Tetrasiklin	-	-	-	-	-	-	-	-
Tigesiklin	60	9.8	0	0	-	-	65	81.5
Tobramisin	-	-	-	-	50	66.7	30.8	14.7
Trimetoprim/Sulfametoksazol	40	25	60	20	-	-	0	11.5

\* Duyarlılık oranları 30'dan az izolat için hesaplanmıştır.

\*\* Test edilmeyen antibiyotik

(#) *Acinetobacter baumannii*'de siprofloksasin için, *Pseudomonas aeruginosa*'da sefepim, seftazidim, siprofloksasin, imipenem levofloksasin ve piperasilin/tazobaktam için verilen duyarlılık oranları I (Duyarlı, yüksek doz) verilerini içermektedir.



Şekil 2. Üriner enterik bakterilerde servis ve yoğun bakım hastalarından izole edilen şuşlar arasındaki duyarlılık oranlarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı tespit edildiği antibiyotikler.



## TARTIŞMA

Kümülatif antibiyotik duyarlılık raporları, antimikrobiyal yönetim programlarının önemli bir unsurudur. Klinik örneklerden alınan kültür sonuçlarının raporlanması öncesinde şüpheli bakteri enfeksiyonunun ampirik tedavisinin seçiminde kullanılır<sup>(11)</sup>.

Hastanelerde, temel olarak uygun ampirik tedavi için başvurulabilecek iki ana bilgi kaynağı vardır. Bunlar; Klinik Uygulama Kılavuzları ve kümülatif yerel antibiyogram raporlarıdır. Klinik uygulama kılavuzları, çoğunlukla belirli bir enfeksiyon için hangi antimikrobiyallerin uygulanabileceğini gösteren ve uluslararası düzeyde üzerinde uzlaşmış kılavuzlar olmakla birlikte, yerel ve bölgesel veriler bu kılavuzlarda yer almaz<sup>(12)</sup>. Hebert ve ark.<sup>(13)</sup> ampirik tedavilerin daha doğru bir şekilde uygulanması için yerel antimikrobiyal duyarlılık verilerini kullanmanın yararını yaptıkları bir çalışmada bildirmişlerdir. Buna karşın antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının, tedavi sırasında gelişen direncin takip edilmesinde çeşitli sınırlamaları da vardır. Antimikrobiyal duyarlılık test sonucu, antimikrobiyal tedaviye rehberlik etmede değerli bir araç iken önceki enfeksiyon öyküsü ve antibiyotik kullanımı gibi diğer hasta faktörlerinin de dikkate alınması gerekmektedir<sup>(14)</sup>.

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin amaçlarından biri, hastane kaynaklı enfeksiyonlar için ampirik antimikrobiyal tedavi seçimine rehberlik etmek olsa da, bu alandaki güvenilirliği geniş çapta değerlendirilmemiştir<sup>(14)</sup>. Bantar ve ark.<sup>(15)</sup> yaptıkları çalışmada duyarlılık verilerini değerlendirmede kullanılan iki farklı yöntemini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada ilk olarak laboratuvara gönderilen bütün örnekleri kapsayan, laboratuvar çalışmalarına dayalı olarak belirlenen bir grup antibiyogram sonucu ile ikinci olarak içinde enfeksiyon hastalıkları, dahiliye ve klinik mikrobiyoloji uzmanlarının da olduğu ve sonuçların klinik temelli olarak değerlendirildiği diğer bir grup antibiyogram sonucu verileri karşılaştırılmıştır. Sadece raporlanan antibiyogram sonucu hastanın kliniği ile birlikte yorumlanmadığı sürece güvenilir olmaz, nitekim bu çalışmada da bu bulunmuştur. Yalnızca nozokomial enfeksiyonlara neden olduğu

belirlenen ve uygun şekilde toplanan örneklere klinik temelli antibiyogram uygulanmıştır. Bu çalışmaya göre klinik temelli antibiyogram sonuçlarına bakıldığında *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *P. mirabilis* ve MRSA için direnç oranlarının laboratuvar bazlı antibiyogram sonuçlarına göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu ancak *P. aeruginosa* için ise durumun tam tersi olduğu bildirilmiştir<sup>(15)</sup>.

Hastaneye ait duyarlılık verilerinin toplu olarak değerlendirilmesi, hastanenin belirli servis veya alanlarındaki direnç gelişim eğilimlerini gizleyebilir. Bu durumda kılavuzlarda da belirtildiği üzere kümülatif antimikrobiyal duyarlılık testi verileri çeşitli parametrelere göre tabakalandırılabilir<sup>(16)</sup>. Pakyz ve ark.<sup>(14)</sup> servis özelinde yapılan değerlendirmelerin daha doğru sonuçlar verdiğini ve her birimi kendi içerisinde değerlendirmenin daha isabetli olacağını bildirmişlerdir. Bu veriler ışığında çalışmamıza ait hasta verileri servis ve yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan elde edilenler olmak üzere iki gruba ayrılarak değerlendirilmeye alınmıştır. Yeterli örnek sayısı üzerinden değerlendirme yapmak adına servisler ve YBÜ'leri kendi içlerinde alt gruplara ayrılmamıştır. Yeterli sayıda örnek ve izolat olması durumunda her bir servis ya da yoğun bakım için ayrı ayrı oluşturulmuş kümülatif antibiyogram verileri şüphesiz daha değerli olacaktır.

Ülkemizde az sayıda yayınlanan kümülatif antibiyogram raporlarından bazıları incelendiğinde; Kurç ve ark.'nın<sup>(17)</sup> yaptıkları iki yıllık çalışmada, idrar örneklerinde *E. coli* için ampirik tedaviye en uygun antibiyotiklerin karbapenem grubu antibiyotikler, amikasin, sefotetan, piperasilin/tazobaktam, nitrofurantoin ve fosfomisin olduğu idrar dışı örneklerde ise amikasin, seftriakson, sefaperazon-sulbaktam, piperasilin/tazobaktam ve yine karbapenem grubu antibiyotikler olduğu saptanmıştır. *K. pneumoniae* için ise idrar örneklerinde en yüksek duyarlılık oranı amikasin, gentamisin ve imipenem de saptanmış, idrar dışı örneklerde ampirik tedavi için sadece imipenemin uygun olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer olarak *K. pneumoniae* izolatlarında duyarlılığın genel olarak azaldığı görülmektedir. Kurç MA ve ark.<sup>(17)</sup> yayınlarında, antibiyotik duyarlılık sonuçlarındaki yıllara göre gelişen değişimi izlemenin

ve bu değişikliğin istatistiksel analizinin yapılmasının daha doğru bir yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda olduğu gibi bu raporda da yeterli veri olmadığı için yıllara göre direnç oranlarındaki değişimi gösterir istatistiksel analiz yapılamamıştır.

Bu çalışmaya dahil edilen hasta örnekleri servis ve yoğun bakım olmak üzere iki ayrı grup halinde incelenmiş ve antibiyotik duyarlılık oranları bu iki grup arasında istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Gram pozitif bakterilerde sadece KNS grubu bakterilerde klindamisin duyarlılığında, nonfermentatif bakterilerde ise özellikle amikasin, levofloksasin ve karbapenem grubu antibiyotiklerin duyarlılığında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. *Enterobacteriales* grubu etkenler değerlendirildiğinde ise *E. coli*'de duyarlılık oranlarında servis ve yoğun bakım izolatları arasında çok fazla bir fark gözlenmezken *K. pneumoniae*'da hem enterik hem de üriner enterik bakterilerde duyarlılığı incelenen antibiyotiklerin neredeyse tamamında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

Yürüyen C ve ark.<sup>(18)</sup> 2018 yılında yayınladıkları ve yoğun bakım hastalarına ait örnekleri dahil ettikleri kümülatif antibiyogram çalışmasında dünyada en sık izole edilen enterik bakterinin *E. coli* ve nonfermentatif etkenin *P. aeruginosa* olduğunu, kendi çalışmalarında ise ilk sırada izole edilen etkenlerin *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* olduğunu bildirmişlerdir. *A. baumannii*'de beta-laktam grubu antibiyotiklerdeki duyarlılık oranını %10'un altında, kolistine karşı duyarlılık oranını ise *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'da %98'in üzerinde bildirmişlerdir. Enterik izolatlarda *K. pneumoniae*'da kolistin duyarlılığı %73-80 arasında, *E. coli*'de kolistin ve tigesiklin ile birlikte karbapenemlere duyarlılık oranlarını %90'ın üzerinde tespit etmişlerdir<sup>(18)</sup>. Bizim çalışmamızda en sık izole edilen enterik etken *K. pneumoniae* iken ilk sırada yer alan üriner enterik etken *E. coli* olarak tespit edilmiştir. *A. baumannii* ise en sık izole edilen nonfermentatif bakteri olmuştur. *A. baumannii*'de karbapenem duyarlılığı %5'in altında bulunmuştur. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'da en etkili antibiyotiklerin sırası ile tigesiklin ve tobramisın olduğu tespit edilmiştir. Kolistin duyarlılığının tespiti için EUCAST tarafından önerilen mikrodilüsyon yönteminin çalış-

lamamış olması çalışmanın zayıf noktası olup, bu antibiyotiğe ilişkin MİK değerleri ve duyarlılık verilerine bulgularda yer verilememiştir. Çalışmamıza dahil edilen enterik bakterilerdeki duyarlılık oranları incelendiğinde ise bu çalışmadan farklı olarak *K. pneumoniae*'da karbapenem duyarlılığının %30'un altında olduğu görülmüştür. Enterik etkenler içerisinde izole edilen *E.coli*'de en etkili antibiyotiklerin ise tigesiklin ve sefuroksim olduğu tespit edilmiştir.

Diğer bir kümülatif antibiyogram çalışmasında Öksüz ve ark.'nın<sup>(2)</sup> en sık izole ettikleri Gram pozitif bakteri KNS olmuştur. İkinci sıklıkta izole ettikleri *S. aureus* izolatlarına ait duyarlılık sonuçlarını metisiline dirençli ve duyarlı olmak üzere iki farklı şekilde vermişlerdir. Her iki grupta da en etkili antibiyotikler vankomisin, teikoplanin ve linezolid olarak bildirilmiştir<sup>(2)</sup>. Bizim çalışmamızda metisiline dirençli ve duyarlı izolat sayısı her bir grup için <30 olmakla birlikte diğer antibiyotiklere duyarlılık durumlarını değerlendirmek amacıyla yapılan karşılaştırmada en etkili bulduğumuz antibiyotikler vankomisin ve linezolid olmuştur. Çalışmamızda da bu araştırmaya benzer şekilde KNS'ler en sık izole edilen Gram pozitif bakteriler olmuştur. Öksüz ve ark.<sup>(2)</sup> *E. faecalis*'e karşı en etkili antibiyotiğin sırasıyla linezolid, vankomisin ve teikoplanin olduğunu *E. faecium*'a karşı ise yalnızca linezolidin ampirik tedavide kullanılabileceğini bildirmişlerdir. VRE oranını ise *E. faecalis* ve *E. faecium*'da sırasıyla % 4.7 ve % 22 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarına karşı en etkili antibiyotiklerin tigesiklin, vankomisin, linezolid ve tetrasiklin olduğu bulunmuş ve bu izolatlardaki VRE oranı ise *E. faecalis*'te %5.3 ve *E. faecium*'da %10 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* ve *A. baumannii* türlerinde başta olmak üzere pek çok antibiyotik için duyarlılık oranlarındaki azalma ampirik olarak tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerini bir hayli kısıtlamaktadır. Hastanemiz verileri değerlendirildiğinde, özellikle hastane enfeksiyon etkenlerinin önemli bir düzeyde çoklu ilaç direncine sahip olmaları nedeniyle kümülatif antibiyotik duyarlılık raporlarının hastane yönetimi ve enfeksiyon kontrol komitesi kanalıyla ilgili kliniklerle paylaşımı-

nın hastanede yürütülen antibiyotik tedavi politikalarının yönlendirilmesinde kritik öneme sahip olacağı düşünülmektedir.

Kümülatif antibiyotik duyarlılık raporlarının hastane özelinde yıllık ve birbirini takip eden en az üç yıllık verileri içerecek şekilde ulusal ve uluslararası rehberler ışığında hazırlanması ve ilgili kurum ve kişilerle paylaşılması yerel ve ulusal düzeyde yürütülen antimikrobiyal yönetim programlarının en önemli bileşenidir.

**Etik Kurulu Onayı:** Bu çalışma, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (04.12.2020 tarih ve 2011-KAEK-2) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Afyonkarahisar Health Sciences University, Clinical Research Ethics Committee (12.04.2020/2011-KAEK-2).

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

#### KAYNAKLAR

- Kohlmann R, Gatermann SG. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data – The influence of different parameters in a routine clinical microbiology laboratory. PLoS One. 2016;11(1):e0147965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147965>
- Oksuz L, Aktas Z. Bir üniversite hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin kümülatif antibiyogram sonuçları. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi. 2020;3(2):35-44. <https://doi.org/10.26650/JARHS2020-732729>
- Ceken N, Duran H, Atik B. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının 4 yıllık direnç profili. Pam Tıp Derg. 2021;14(2):306-11. <https://doi.org/10.31362/patd.789332>
- Hindler JF, Stelling J. Analysis and presentation of cumulative antibiograms: a new consensus guideline from the Clinical and Laboratory Standards Institute. Clin Infect Dis. 2007;44(6):867-73. <https://doi.org/10.1086/511864>
- Çırarıl P. Ülkemizde yoğun bakım ünitelerinde antimikrobiyal direnç sorunu. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2016;46(3):97-104. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2016.097>
- Söyletir G. Antimikrobiyal duyarlılık testleri ve klinik yansımaları. Türkiye Klinikleri J Inf Dis Special Topics. 2017;10(1):26-9
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, valid from 2021-01-01. [[https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_11.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf)] (Erişim tarihi: 15/05/2021)
- CLSI. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data. 4th Edition. Document M39-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne: ABD; 2014.
- KLİMUD. Tıbbi mikrobiyoloji uzmanları için antibiyotik duyarlılık verilerinin analizi ve sunumu rehberi. KLİMUD Kaynak No:15, Ankara, 2019.
- KLİMUD. Klinik örnekten sonuç raporuna uygulama rehberi: Kan dolaşımı örnekleri. KLİMUD Kaynak No:13, Ankara, 2017.
- von Knorring N, Nana T, Chibabhai V. Cumulative antimicrobial susceptibility data for a tertiary-level paediatric oncology unit in Johannesburg, South Africa. SA J Oncol. 2019;3(0):a65. <https://doi.org/10.4102/sajo.v3i0.65>
- Morales A, Campos M, Juarez JM, Canovas-Segura B, Palacios F, Marin R. A decision support system for antibiotic prescription based on local cumulative antibiograms. J Biomed Inform. 2018;84:114-22. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2018.07.003>
- Hebert C, Ridgway J, Vekhter B, Brown EC, Weber SG, Robicsek A. Demonstration of the weighted-incidence syndromic combination antibiogram: an empiric prescribing decision aid. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012;33(4):381-8. <https://doi.org/10.1086/664768>
- Pakyz AL. The utility of hospital antibiograms as tools for guiding empiric therapy and tracking resistance. Pharmacotherapy. 2007;27(9):1306-12. <https://doi.org/10.1592/phco.27.9.1306>
- Bantar C, Alcazar G, Franco D, et al. Are laboratory-based antibiograms reliable to guide the selection of empirical antimicrobial treatment in patients with hospital-acquired infections? J Antimicrob Chemother. 2007;59(1):140-3. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl434>
- Kuster SP, Ruef C, Zbinden R, et al. Stratification of cumulative antibiograms in hospitals for hospital unit, specimen type, isolates sequence and duration of hospital stay, J Antimicrob Chemother. 2008;62(6):1451-61. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn384>
- Kurç MA, Tombak Ö, Gülen D, Topkaya AE, Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi kümülatif antibiyotik duyarlılık raporu. Ankem Derg. 2018;32(1):17-24. <https://doi.org/10.5222/ankem.2018.017>
- Yürüyen C, Daldaban Dinçer Ş, Yanılmaz Ö, Boz ES, Aksaray S. Yoğun bakım ünitelerinde kümülatif antibiyogram ile antibiyotik direncinin izlenmesi. Mikrobiyol Bul. 2018;52(4):329-39. <https://doi.org/10.5578/mb.67408>

# Bir Üniversite Hastanesinde Anti-DFS70 Antikor Pozitif Olguların İki Yıllık Retrospektif Değerlendirilmesi

## Two-Year Retrospective Evaluation of Anti-DFS70 Antibody Positive Cases in a University Hospital

Rahime Aksoy\*<sup>✉</sup>, Ebru Us\*\*<sup>✉</sup>

\*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji-1 Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

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

**Atf/Cite as:** Aksoy R, Us E. Bir üniversite hastanesinde Anti-DFS70 antikor pozitif olguların iki yıllık retrospektif değerlendirilmesi, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):393-99.

### Öz

**Amaç:** Anti-nükleer antikorların (ANA) varlığı sistemik bağ dokusu hastalıklarının önemli göstergelerindedir. Anti-DFS70 otoantikorunun sağlıklı bireylerde de görüldüğü bilinmektedir ve hastalıklarla ilişkisi henüz belirlenmemiştir. Çalışmamızda, İndirekt İmmün Floresan-ANA (IIF-ANA) ve İmmünoblot yöntemi ile anti-DFS70 antikor pozitifliği saptanmış hastaların klinik yakınma, tanıları ve inflamasyon parametreleri [C-reaktif protein (CRP), Eritrosit Sedimentasyon Hızı (ESR) ve Romatoid Faktör (RF)] ile arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı.

**Yöntem:** Çalışmaya, 4–90 yaş aralığında 412 (%91.5) kadın, 38 (%8.5) erkek, 450 hasta dâhil edildi. Hastaların klinik tanıları ve inflamasyon parametreleri retrospektif olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Yakinmalar, ağrı (126/136) ve döküntü, nefes darlığı, kaşıntı (10/136) idi. Ağrı yakınması olan hastaların 81'inde (%64.3) inflamasyon belirlenemezken, 45'inde (%35.7) saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.001$ ). İnflamasyon, bağ dokusunun sistemik tutulumu olan hastaların 106'sında (%67.9) negatif, 50'sinde (%32.1) pozitif ( $p<0.001$ ), ürtikerli hastaların 19'unda (%95) negatif, 1'inde (%5) pozitif bulundu ( $p<0.001$ ). Kesin tanı alan 60 hastanın 10'unun bağ dokusunun sistemik tutulumu, 10'unun ürtiker, 40'ının ise farklı tanıları vardı.

**Sonuç:** Çalışmamızda, DFS70 pozitifliğinin kadınlarda daha yüksek olduğu ve bu paternin pek çok hastalığa eşlik edebileceği sonucuna varıldı. Çalışmamız ağrı yakınmasının nedeninin inflamasyon parametreleri de elendiğinde DFS70 antikoruna olabileceğini ve ürtiker ile DFS70 otoantikorları arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Anti-nükleer antikorlar, DFS70, IIF-ANA, immünoblot, enflamasyon

### ABSTRACT

**Objective:** The presence of anti-nuclear antibodies (ANA) are important indicators of systemic connective tissue diseases. Anti-DFS70 autoantibody is also known to be found in healthy individuals and has not yet been identified in relation with diseases. The aim of our study was to investigate the relationship between clinical complaints, diagnoses and inflammation parameters [C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and rheumatoid factor (RF)] of patients with anti-DFS70 antibody positivity detected by Indirect Immune Fluorescent-ANA (IIF-ANA) and Immunoblot method.

**Method:** A total of 450 patients, 412 (91.5%) women and 38 (8.5%) men, between the ages of 4–90, were included in the study. The clinical diagnoses and inflammation parameters of the patients were evaluated retrospectively.

**Results:** Complaints were pain (126/136) and rash, dyspnea, pruritus (10/136). While inflammation was not detected in 81 (64.3%) of the patients with pain complaints, it was found in 45 (35.7%) and was found to be statistically significant ( $p=0.001$ ). Inflammation was found to be negative in 106 (67.9%) patients with systemic involvement of connective tissue, positive in 50 (32.1%) patients ( $p<0.001$ ), negative in 19 (95%) and positive in 1 (5%) patients with urticaria ( $p<0.001$ ). Ten of the 60 patients with a definitive diagnosis had systemic involvement of the connective tissue, 10 had urticaria, and 40 had different diagnoses.

**Conclusion:** It was concluded that DFS70 positivity was higher in women and this pattern may accompany many diseases. Our study suggests that the cause of pain may be the DFS70 antibody when inflammation parameters are eliminated, and that there may be a relationship between urticaria and DFS70 autoantibodies.

**Keywords:** Anti-nuclear antibodies, DFS70, IIF-ANA, immunoblot, inflammation

**Alındığı tarih / Received:**  
12.04.2021 / 12.April.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
02.08.2021 / 02.August.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

R. Aksoy 0000-0001-8433-3627  
E. Us 0000-0001-9705-1792

✉ rahimeaksoy77@yahoo.com

## GİRİŞ

Anti nükleer antikorlar (ANA); hücre çekirdeğindeki yapılara karşı oluşan antikorlardır ve çoğunlukla sistemik otoimmün hastalıkların teşhisinde kullanılır<sup>(1,2)</sup>. Otoantikorların saptanması; tanı, prognoz ve bazı durumlarda bu hastalıkların klinik takibi ve tedavisine yardımcı olurlar<sup>(3)</sup>. Yoğun ince benekli (DFS70) olarak tanımlanan bir antinükleer antikor ilk olarak 1994 yılında, Ochs ve ark.<sup>(4)</sup> tarafından interstisyel sistitli hastalarda rapor edilmiştir. Yoğun ince benekli (DFS70-LEDGF) boyanma modelinde antikor, 70-kDa'luk lens epitelyum kaynaklı büyüme faktörüne (LEDGF) karşı olup, mitotik hücrelerin kromozomunun ve interfazdaki nükleusun yoğun ince benekli boyanma göstermesi ile karakterizedir<sup>(5,6)</sup>.

Anti-DFS70 antikorları, çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklar, kanser, HIV pozitifler, alopesi areatali ve atopik dermatitli hastalarda pozitif bulunurken, sağlıklı bireylerde de değişken oranlarda pozitif bulunduğu bilinmektedir<sup>(2,7)</sup>. Anti-DFS70 otoantikorlarının koruyucu, patojenik veya sensör rollerinden hangilerine sahip olduğu hâlâ bilinmemektedir. Nükleer yoğun ince benekli boyanma modelinin gözlenmesi genellikle ANA-ilişkili romatizmal hastalığı olmayan sağlıklı bireylerde karşılaşılan bir olgudur. Tek başına anti-DFS70 antikor pozitifliği ANA ilişkili romatizmal hastalığı olanlarda %1'den daha az, sağlıklı bireylerde ise %22'ye kadar saptanabilmektedir<sup>(6,8)</sup>.

Akut faz yanıtı; enfeksiyon, inflamasyon ve travmaya karşı ortaya çıkan özgün olmayan bir süreçtir. Temelde enfeksiyonun vücuda olan zararlarının kontrol edilmesi amaçlanır. ESR, CRP, akut faz yanıtının birer parçasıdır ve enfeksiyon hastalıklarının tanısında sıklıkla kullanılan indirekt tanı yöntemleridir<sup>(9,10)</sup>.

İnflamasyon biyobelirteçlerinden CRP, ESR ve genellikle romatizmal hastalıkların tanısında kullanılan RF sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir. RF testi aynı zamanda romatoid artrit, karışık bağ dokusu hastalığı, Sjögren sendromu, skleroderma, dermatomyozit, sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklar, enfeksiyöz mononükleoz gibi bazı viral

hastalıklar ve bazı akut iltihabi hastalıklarda da pozitif bulunduğu için seçilmiştir<sup>(11,12)</sup>. ANA, RF ve akut faz reaktanları potansiyel otoimmüniteyi tanımlamak için kullanılan laboratuvar testlerindedir. Bu çalışmada, DFS70 antikor pozitifliği ile hastalık ilişkisini ortaya koyabilmek için hastaların klinik yakınma, ön tanı ve kesin tanıları ve inflamasyon parametreleri olan CRP, RF ve ESR değerleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından (12.09.2019 tarih ve 13-64-19 karar No.) onaylanmıştır.

Çalışmaya Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji-1 Laboratuvarı'na 11.08.2017-12.09.2019 tarihleri arasında IIF-ANA testi istemi ile gönderilen ve indirekt immunfloresan ve İmmünoblot yöntemi ile Anti-DFS70 otoantikor pozitifliği tespit edilen 450 hasta dâhil edilmiştir. DFS70 varlığının saptanması için "Antibodies against cell nuclei"-IgG (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test kitleri kullanılmış, hasta serumları 1/100 oranında dilüe edilerek çalışılmıştır. Üretici firmanın test prosedürleri doğrultusunda çalışılan IIF testinin, değerlendirilmesinde floresan mikroskop (Zeiss, Almanya) kullanılmıştır. Yoğun ince benekli (Anti-DFS70) patern, HEp-2 hücrelerinin nükleoplazmalarının ve metafaz safhasındaki hücrelerin kromozomal alanlarının yoğun, heterojen benekli boyanması, beneklerin büyüklük, parlaklık ve yoğunluklarının farklılıklar göstermesi ile tanımlanmıştır. Mikroskopik değerlendirmede 40x objektifler kullanılmış ve iki bağımsız araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir. HEp-2 substratlarında bu paternin tanınması, diğer nükleer paternlerle karıştırılabileceği için zordur. Bu nedenle, anti-DFS70 otoantikorlarının varlığı pozitif bir DFS70 IIF-ANA sonucunun ardından immünoblot yöntemi ile doğrulanmıştır. İmmünoblot testi Euroline ANA Profile 3 plus DFS70 (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Almanya) kiti ile üretici firma prosedürlerine uyularak çalışılmıştır. Beraberinde farklı ANA paterni belirlenen örnekler çalışma dışı bırakılmıştır. Anti-DFS70 antikor pozitifliği saptanan tarihte CRP, RF ve ESR

**Tablo 1. DFS 70 paterni tespit edilen hastaların yaş dağılımları.**

Yaş	Sayı	%
4-20	49	10.9
21-40	180	40
41-60	145	32.2
61-80	73	16.2
81-90	3	0.7
Toplam	450	100

değerleri de taranmıştır. Yaş ve cinsiyet bilgileri bulunan hastaların klinik bilgileri retrospektif olarak incelenmiştir.

**İstatistiksel analiz:** Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare ve Fisher's Exact test kullanılmıştır. İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 11.5 (ABD) ile yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistiklerde n (%) olarak verilmiş, p değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen yaş aralığı (4-90) (Tablo 1) olan 450 hastanın 412'si (%91.5) kadın, 38'i (%8.5) erkektir. Kırk yaş üzerinde otoimmün hastalık görülme sıklığı arttığından hastaları 40 yaş üzeri, 40 yaş ve altı olarak iki kategoriye ayrılarak yaş ve inflamasyon parametreleri karşılaştırıldı (Tablo 2). İnfamasyon parametrelerinin 40 ve altı yaş hastaların 184'ünde (%80.3) negatif, 45'inde (%19.7) pozitif olduğu ( $p<0.001$ ), 40 yaş üstündeki hastaların 133'ünde (%60.2) negatif, 88'inde (%39.8) pozitif olduğu ( $p=0.005$ ) tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Yakınması olan 136 hastanın 126'sı ağrı, 10 hasta ise döküntü, nefes darlığı ve kaşıntı yakınmaları ile başvurduğu belirlendi. Yakınması olan 136 hastadan 88'inde (%64.7) inflamasyon bulgusu yokken, 48'inde (%35.3) inflamasyon bulgusuna rastlandı. Ağrı yakınması olan hastaların 81'inde (% 64.3) inflamasyon bulgusu negatifken 45'inde (%35.7) inflamasyon bulgusu pozitif ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.001$ ). Diğer yakınmaları ise 7 hastada (%70) inflamasyon bulgusu negatif bulunurken, 3 hastada (%30) inflamasyon bulgusu pozitif olarak saptandı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı

**Tablo 2. DFS 70 paterni belirlenen hastaların yakınma, ön tanı, kesin tanılarına göre enfeksiyon bulguları.**

	ESR, CRP, RF		Toplam	p
	Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
YAŞ	317 (70.5)	133 (29.5)	450	<0.001
<=40	184 (80.3)	45 (19.7)	229	0.005
>40	133 (60.2)	88 (39.8)	221	
YAKINMA	88 (64.7)	48 (35.3)	136	0.001
Ağrı	81 (64.3)	45 (35.7)	126	0.206
Diğer	7 (70.0)	3 (30.0)	10	
ÖN TANI	264 (70.6)	110 (29.4)	374	
BDST	106 (67.9)	50 (32.1)	156	<0.001
Eklemler ağrısı	42 (67.7)	20 (32.3)	62	0.005
EDB	37 (71.2)	15 (28.8)	52	0.002
Ürtiker	19 (95.0)	1 (5.0)	20	<0.001
Diğer	60 (71.4)	24 (28.6)	84	<0.001
KESİN TANI	40 (66.7)	20 (33.3)	60	
BDST	7 (70)	3 (30)	10	0.317
Ürtiker	8 (80.0)	2 (20)	10	0.058
Diğer	25 (62.5)	15 (37.5)	40	0.086

ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP: C Reaktif Portein, RF: Romatoid faktör, BDST: Bağ dokusunun sistemik tutulumu, EDB: Eklemin diğer bozuklukları

olmadığı görüldü ( $p=0.206$ ) (Tablo 2).

Ön tanı alan hastaların 156'sı bağ dokusunun sistemik tutulumu (BDST), 62'si eklem ağrısı, 52'si eklemin diğer bozuklukları (EDB), 20'si ürtiker, 84'ü farklı tanıları aldıkları saptandı. Üç yüz seksen altı hastadan 264'ünde (%70.6) inflamasyon bulgusu yokken, 110'unda (%29.4) inflamasyon bulgusuna rastlanmıştır. İnfamasyon bulgularına bakıldığında ise BDST'li hastaların 106'sı (%67.9) negatif, 50'si (%32.1) pozitif ( $p<0.001$ ) olarak belirlendi. Eklem ağrısında, 42'si (%67.7) negatif, 20'si (%32.3) pozitif ( $p=0.005$ ), EDB'li hastaların 37'si (%71.2) negatif, 15'i (%28.8) pozitif ( $p=0.002$ ), ürtikerli hastaların 19'u (% 95) negatif, 1'i (%5) pozitif ( $p<0.001$ ), diğer hastaların 60'ı (%70.6) negatif, 24'ü (%28.6) pozitif bulundu ( $p<0.001$ ) (Tablo 2).

Kesin tanı alan hastaların 10'u BDST, 10'u ürtiker, 40'ı farklı tanıları (Tablo 3) aldıkları görüldü. Altmış hastadan 40'ında (%66.7) inflamasyon bulgusu yokken, 20'sinde (%33.3) inflamasyon bulgusuna rastlanmıştır. İnfamasyon bulgularına bakıldığında ise BDST'li hastaların 7'si (%70) negatif, 3'ü (%30) pozitif ( $p=0.317$ ), ürtikerli hastaların, 8'i (%80) negatif, 2'si (%20) pozitif ( $p=0.058$ ) bulundu. Diğer hastaların 25'i (%62.5) negatif, 15'i (%37.5) pozitif bulundu (Tablo 2).

**Tablo 3. DFS 70 paterni saptanan hastaların klinik kesin tanıları.**

Tanı	Sayı	%
Ailevi Akdeniz ateşi (FMF)	2	3.3
Alerjik rinit	2	3.3
Amiloidozis	1	1.7
Anjionörotik ödem	1	1.7
Ankilozan spondilit	4	6.6
Astım	3	5
Bağ dokusunun sistemik tutulumu	10	16.6
Behçet hastalığı	2	3.3
Dermatit	1	1.7
Eklem ağrısı	4	6.6
Eklem diğer bozuklukları	2	3.3
Fibromiyalji	3	5
Gonartroz	1	1.7
Karaciğer hastalığı	1	1.7
Kronik böbrek yetmezliği	1	1.7
Kronik obstrüktif akciğer hastalığı	1	1.7
Lupus eritematozus	1	1.7
Morphea	1	1.7
Poliartroz	1	1.7
Reynaud sendromu	2	3.3
Romatoid artrit	3	5
Sarkoidoz	1	1.7
Sjögren sendromu	1	1.7
Takayasu arteriti	1	1.7
Ürtiker	10	16.6
Toplam	60	100.0

## TARTIŞMA

Çalışmamızda, anti-DFS70 antikor pozitiflikleri altın standart test olan IIF-ANA ile belirlenen ve immüno-blot yöntemi ile onaylatılan hastaların, klinik yakınma, ön tanı ve kesin tanıları ve inflamasyon parametreleri olan CRP, RF ve ESR değerleri ile anti-DFS70 antikor pozitiflikleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı.

DFS70 boyama paterni mitotik hücrelerin kromozomunun ve interfazdaki nükleusun yoğun ince benekli boyanma göstermesi ile karakterizedir<sup>(5,6)</sup>. Son zamanlarda, düşük seviyeli bir DFS paterni tanımlanmış ve International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns (ICAP) sınıflandırma algoritmasına bir “yalancı DFS” örüntüsü olarak dâhil edildi<sup>(13)</sup>. IIF-ANA testi ile belirlenen DFS70 paterleri immüno-blot yöntemi ile doğrulandı.

Çalışmamızda, DFS70 paternindeki ANA pozitifliğinin kadın (n=412) hastalarda, erkek (n=38) hastalara göre sık görüldüğü saptandı. Bu sonuç, otoimmün hastalıkların kadınlarda erkeklere göre daha sık

görüldüğünü bildiren daha önceki çalışmalarla uyumlu bulundu<sup>(14,15)</sup>. Hastaların dekatlara göre yaş dağılımı Tablo 1’de verilmiştir. Oranların kadın hastalarda oldukça yüksek olması bu hastaların otoimmün hastalık yönünden taranması gerekliliğini düşündürmektedir. Buna karşılık, çalışmamızdaki anti-DFS70 pozitif erkek sayısının kesin sonuçlara varmak için yetersiz olduğu düşünülebilir.

DFS70 paterni en sık 21–40 yaş (179 hasta, %39.8) ve 41–60 yaş (146 hasta, %32.5) aralığında, en az 81–90 yaş (3 hasta, %0.6) aralığındaki hastalarda belirlenmiştir. Otoimmün hastalıkların 20–60 yaş arasında kadınlarda daha fazla görülmesi bulgularımızla da uyumludur<sup>(16)</sup>. Watanabe ve ark.<sup>(8)</sup> anti-DFS70 antikorlarının 35 yaşın altındaki bireylerde 35 yaşın üzerindeki bireylere göre anlamlı olarak daha sık olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda, 40 yaş altı ve 40 yaş üstü hastalarda DFS70 antikor pozitifliği açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Çalışmamızda, ileri yaşlarda DFS70 paterni görülme sıklığının azaldığı saptandı ve bu bulgu diğer çalışmalarla uyumlu bulundu<sup>(17-19)</sup>. İnflamasyonun 40 yaş altı hastaların 184’ünde (%80.3) negatif, 45’inde (%19.7) pozitif olduğu (p<0.001) 40 yaş üstü hastaların 133’ünde (%60.2) negatif, 88’inde (%39.8) pozitif olduğu (p=0.005) görüldü. Bu sonuçlar bize yakınma, ön tanı, kesin tanı yönünden değerlendirilen hastaların hastaneye başvuru nedeninin DFS70 antikorunun neden olduğu semptomlar olduğunu düşündürdü. Başvuru yapan hastaların ağrı yakınmasının inflamasyon kaynaklı olmadığı belirlendi.

Takeichi ve ark.<sup>(20)</sup> yaptıkları çalışmada, DFS70 aktivasyonu ve inflamasyon arasında bir ilişki olduğunu ve DFS70’in keratinositlerden TNF ve IL-8 sitokinlerinin salınmasını uyardığını gösterdiler. Proinflamatuvar sitokinlerin üretimini sağlaması DFS70 antikorları ile birlikte bir inflamasyonun da gerektiğini düşündürmektedir. Bulgularımız DFS70 ve inflamasyon arasında bir ilişki olmadığını düşündürdü. Sağlıklı popülasyonda yüksek DFS70 otoantikor prevalansı ve ANA ile ilişkili otoimmün romatizmal hastalıklar arasında negatif ilişki bildiren çalışmalar söz konusudur<sup>(3,8)</sup>. Ayrıca DFS70’in, stres, antioksidan ve diğer koruyucu genleri transkripsiyonel olarak aktive ederek çevre-

sel stres faktörlerine karşı hücrel korumayı teşvik ettiği varsayılmaktadır<sup>(21)</sup>. Bulgularımız bu otoantikorumun 40 yaş altında koruyucu rolleri olabileceğini de düşündürmektedir.

Çalışmamızda, hastalarda en sık rastlanan yakınmaların ağrı olduğu görülmüştür (126 hasta, %92.6). Bu hastalar ağrı kaynağı olabilecek inflamasyon parametresi yönünden değerlendirildiğinde ise hastaların 81'inde (%64.3) inflamasyon bulgusu negatifken, 45'inde (%35.7) inflamasyon bulgusu pozitif bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p=0.001$ ). Bu sonuçlar bize ağrı kaynağının DFS70 antikoru olabileceğini düşündürmektedir. Jeong ve ark.<sup>(22)</sup> yaptıkları bir çalışmada, DFS70 antikorunun fibromiyalji (FM), hastalarında diğer SLE hastalarına oranla daha fazla bulunduğunu göstermişlerdir. Bilindiği üzere FM tanısı koymak için spesifik bir biyobelirteç yoktur. Çalışmamızda, fibromiyalji kesin tanı almış 60 hastanın 3'ünde mevcuttu. Çalışma grubumuzdaki hastaların bu yönden değerlendirilmesinin uygun olacağını düşünüyoruz.

Çalışmamızda ön tanı alan hastaların 156'sı BDST, 62'si eklem ağrısı, 52'si EDB, 20'si ürtiker ön tanısı almışlardı. BDST'li hastaların inflamasyon parametrelerine bakıldığında, 106'sı (%67.9) negatif, 50'si (%32.1) pozitif olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). Hastaların 62'sinde (%16.6) eklem ağrısı olduğu belirlendi. Eklem ağrısı belli bir hastalığa spesifik değildir, inflamasyonla seyreden çok farklı hastalık gruplarında görülebilmektedir. Çalışmamızda, inflamasyon parametreleri eklem ağrısı bulunan hastaların, 42'sinde (%67.7) negatif, 20'sinde (%32.3) pozitif olarak saptandı. ( $p=0.005$ ). Farinotti ve ark.<sup>(23)</sup> yaptıkları çalışmada, antikorların, belirgin doku hasarı veya iltihabı olmayan koşullarda da ağrı nöronlarını etkileyebildiğini göstermişlerdir. Ağrı olgusu duyuşsal, bireysel ve çevresel birçok öğeden etkilenen subjektif bir duygudur. Psikososyal faktörler, ruh hâli ve yaş da ağrı algısını etkileyebilmektedir. Son araştırmalar, otoantikorların da doğrudan ağrı ile ilişkili olabileceği göstermektedir. IgG aracılı ağrı bozukluklarının, krampolar, spazmlar, yanma, parestezi, delici ağrı ve kaşıntı gibi örtüşen ağrı semptomlarına sahip olduğu

bilinmektedir<sup>(24)</sup>. RA hastalarından veya artrit farelerden sağlıklı farelere saflaştırılmış antiserüline protein antikorları (ACPA) gibi IgG otoantikorların intravenöz enjeksiyonu, iltihaplanmaya neden olmadan ağrıya ve artan ısı ve soğuga duyarlılığa neden olmuştur. Bu durum, otoantikorların ağrıya özgü bir rolü olduğunu düşündürmüştür. Kompleks bölgesel ağrı sendromunda (CRPS) dolaşımdaki antikor düzeylerini önemli ölçüde azaltan plazma değişimi, otoantikorların hastalık semptomlarına neden olmadaki rolünü de desteklemektedir<sup>(25)</sup>. Nöroblastomun disialoganglioside'a karşı antikorlarla tedavisinde, bir yan etki olarak şiddetli ağrı gelişmiştir. Bu durum bazı IgG'lerin ağrıyı indükleyebileceğini göstermektedir<sup>(26)</sup>. Bu sonuçlar, eklem ağrılarının DFS70 otoantikoru kaynaklı olabileceği düşüncemizi desteklemektedir. Yine de DFS70 otoantikorumun ağrı etiolojisindeki rolünün araştırılması ve anlaşılması için daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim vardır.

Ürtiker kısa süreli, eritemli, geçici dermal ödem ve vazodilatasyona bağlı deri kabarıklıklarının görüldüğü kaşıntılı bir dermatolojik hastalıktır. ANA'nın etki mekanizması ve alerjik hastalıklarla ilişkisi iyi anlaşılmamıştır. Otoimmün bir temelin, kronik spontan ürtiker olgularının yaklaşık yarısından sorumlu olduğuna inanılmaktadır. İsrail'de ürtiker tanısı konan 12.778 hastaya ilişkin veriler toplanarak yapılan bir çalışmada, ANA, ürtikerli kadın ve erkeklerde kontrol grubundan daha yaygın bulunmuştur. Hangi otoantikorun pozitif bulunduğu ile ilgili bir bilgi verilmemiştir. RA, ürtikerli hastalarda en sık görülen ikinci otoimmün hastalık olarak bildirilmiştir. Genel popülasyonda RA'nın görülme sıklığı %0.5 ile %1.1 arasında bildirilmişken, ürtikerli kadın hastaların %1.9'unda bulunmuştur. Hastaların çoğuna (%82.9) ürtiker tanısından sonraki 10 yıl içinde RA tanısı konmuştur ve %3.9'u ürtiker tanısından sonraki ilk 6 ayda tanı almıştır<sup>(27)</sup>. Erişkin kronik ürtikerli hastaların yaklaşık %40-50'sinde kendi dokularına karşı oluşmuş otoantikorların rol oynadığı bilinmektedir<sup>(28)</sup>. Çalışmamızda, ürtikerli 20 hastanın inflamasyon parametrelerine bakıldığında, 19'unda (%95) negatif, 1'inde (%5) pozitif olduğu belirlendi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). DFS70 otoantikoru dermatolojik hastalıklar yönünden de değerlendirildi-



rilmelidir. Bizim sonuçlarımız da ürtiker oluşturan nedenin inflamasyondan bağımsız olarak DFS70 otoantikor kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür.

Otoimmünite ile ilgili olarak, son kanıtlar bu antiko- run, sistemik otoimmün hastalığa ilerlemeyen pozitif ANA'lı bireylerin ayırt edilmesinde yararlı bir biyolo- jik belirteç olarak önemini göstermiştir<sup>(3)</sup>. Çalışmamızda, DFS70 otoantikorunu bulunan, farklı sis- temleri ve farklı organları ilgilendiren pek çok hasta- lık saptanmıştır. Çalışma grubumuzdaki hastalarda en çok konulan kesin tanı 10 (%16.6) hasta ile ürtiker olmuştur ve bu da bize ürtiker ile DFS70 otoantikor- ları arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmekte- dir.

Bizzaro ve ark.<sup>(29)</sup> yaptığı çalışmada, neoplastik hasta- lığı olan hasta grubunda 334 kişiden 6'sında (%1.8) DFS70 antikor pozitifliği gösterilmiştir. Çalışmamıza dâhil ettiğimiz DFS70 pozitifliği olan hiçbir hastada kanser tanısı saptanmadı. Çalışmaya aldığımız 450 hastanın yalnızca 60'ına kesin tanı konulmuş olması çalışmanın kısıtlılığını oluşturmaktadır. Hasta dosya- larının detaylı bir şekilde tutulması gerektiğini ve bu hastaların uzun yıllar takip edilmesi gerektiğini gös- termektedir.

**Etik Kurulu Onayı:** Bu çalışma, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafın- dan (12.09.2019 tarih ve 13-64-19 karar No.) onay- lanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conduc- ted with the approval of Ankara University, Human Research Ethics Committee (09.12.2019/13-64-19).

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was decla- red by the authors.

## KAYNAKLAR

- Bagnasco M, Grassia L, Pesce G. The management of the patient with unexpected autoantibody positivity. *Autoimmun Rev.* 2007; 6:347-53. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2007.01.011>
- Sugiura K, Muro Y, Nishizawa Y, et al. LEDGF/DFS70, a major autoantigen of atopic dermatitis, is a component of kerato hyalin granules. *J Invest Dermatol.* 2007;127(1):75-80. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700487>
- Aragón C-C, González JD, Posso-Osorio I, et al. Anti-DFS70 antibodies: A new useful antibody in the exclusion of auto-immune diseases. *Rev Colomb Reumatol.* 2018;25(2):104-11. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2018.01.003>
- Ochs RL, Stein TW Jr, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol.* 1994;151(3):587-92. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)35023-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)35023-1)
- Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol.* 2015; 6: 412. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00412>
- Conrad K, Röber N, Andrade LE, Mahler M. The clinical relevance of anti-DFS70 autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017;52(2):202-16. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8564-5>
- Okamotoa M, Ogawaa Y, Watanabe A, et al. Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J Autoimmun.* 2004;23(3):257-66. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.07.004>
- Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):892-900. <https://doi.org/10.1002/art.20096>
- Hatipoğlu H, Erkal S, Türkmen S, Engerek N, Kurt K, Şiraneci R. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında laboratuvar bulguları. *JOPP Derg.* 2011;3(1):5-11.
- Long SS, Nyquist AC. Laboratory manifestations of infectious diseases. In: Long SS, Pickering LK and Prober CG (eds) *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 3rd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2008:1368-81.
- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-54. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>
- Sáez-Llorens X, Lagrutta F. The acute phase host reaction during bacterial infection and its clinical impact in children. *Pediatr Infect Dis J.* 1993;12(1):83-7. <https://doi.org/10.1097/00006454-199301000-00017>
- Infantino M, Bizzaro N, Grossi V, Manfredi M. The long-awaited 'pseudo-DFS pattern'. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15(5):445. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2019.1596801>

14. Owen JA, Punt J, Stranford SA. *Kuby Immunology*. 7th ed. New York:W.H. Freeman and Co, 2013:517-52.
15. Carbone T, Pafundi V, Tramontano G, et al. Prevalence and serological profile of anti-DFS70 positive subjects from a routine ANA cohort. *Sci Rep*. 2019;9(1):2177. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38686-5>
16. Amador-Patarroyo MJ, Rodriguez-Rodriguez A, Montoya-Ortiz G. How does age at onset influence the outcome of autoimmune diseases? *Autoimmune Dis*. 2012; 2012: 251730. <https://doi.org/10.1155/2012/251730>.
17. Türkoğlu G, Berkem R, Karakoç AE. Investigation of the diagnostic value of anti-dense fine speckled 70/lens epithelium derived growth factor p75 autoantibody for autoimmune diseases. *Mikrobiyol Bul*. 2018;52(4): 413-24. <https://doi.org/10.5578/mb.67385>
18. Kang SY, Lee WI. Clinical significance of dense fine speckled pattern in anti-nuclear antibody test using in direct immuno fluorescence method. *Korean J Lab Med*. 2009;29(2):145-51. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.2.145>
19. Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 494356. <https://doi.org/10.1155/2012/494356>
20. Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Ogawa Y, Akiyama M. LEDGF/DFS70 activates the MK2/IL6/STAT3 pathway in HaCaT. *J Dermatol Sci*. 2011;63(3):203-5. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.05.004>
21. Ochs RL, Mahler M, Basu A, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med*. 2016;16(3):273-93. <https://doi.org/10.1007/s10238-015-0367-0>
22. Jeong J, Kim DH, Park G, Park S, Kim HS. Clinical significance of anti-dense fine speckled 70 antibody in patients with fibromyalgia. *Korean J Intern Med*. 2019;34(2):426-33. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.276>
23. Bersellini Farinotti A, Wigerblad G, Nascimento D, et al. Cartilage-binding antibodies induce pain through immune complex-mediated activation of neurons. *J Exp Med*. 2019;216(8):1904-24. <https://doi.org/10.1084/jem.20181657>
24. Xu M, Bennett DLH, Querol LA, et al. Pain and the immune system: emerging concepts of IgG-mediated autoimmune pain and immunotherapies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(2):177-88. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-318556>
25. Dawes JM, Vincent A. Autoantibodies and pain. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2016;10(2):137-42. <https://doi.org/10.1097/spc.0000000000000211>
26. Raoof R, Willems HLDM, Eijkelkamp N. Divergent roles of immune cells and their mediators in pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(3):429-40. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex308>
27. Confino-Cohen R, Chodick G, Shalev V, Leshno M, Kimhi O, Goldberg A. Chronic urticaria and autoimmunity: associations found in a large population study. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(5):1307-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.043>
28. Magen E, Waitman DA, Dickstein Y, Davidovich V, Kahan NR. Clinical-laboratory characteristics of ANA-positive chronic idiopathic urticaria. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(2):138-44. <https://doi.org/10.2500/aap.2015.36.3829>
29. Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, et al. Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS70-positive subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1107: 174-83. <https://doi.org/10.1196/annals.1381.019>

# *Candida parapsilosis* Tür Kompleksi ve *Lodderomyces elongisporus* İzolatlarının MALDI-TOF MS ile İdentifikasyonu

## Identification of *Candida parapsilosis* Species Complex and *Lodderomyces elongisporus* Isolates with MALDI-TOF MS

Engin Kaplan\*<sup>1</sup>, Ayşe Sultan Karakoyun\*\*<sup>2</sup>, Deniz Alkaya\*\*\*<sup>3</sup>, Nevzat Ünal\*\*\*\*<sup>4</sup>, Aylin Döğen\*\*\*<sup>4</sup>  
Macit İlkit\*\*<sup>2</sup>

\* Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

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

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

\*\*\*\* Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Adana, Türkiye

**Atf/Cite as:** Kaplan E, Karakoyun AS, Alkaya D, Ünal N, Döğen A, İlkit M. *Candida parapsilosis* tür kompleksi ve *Lodderomyces elongisporus* izolatlarının MALDI-TOF MS ile identifikasyonu, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):400-5.

### Öz

**Amaç:** *Candida parapsilosis* tür kompleksi ve *Lodderomyces elongisporus* izolatları virülans, prevalans ve antifungal duyarlılık profilleri yönünden farklılıklara sahip olabilmektedir. Bu türlerin biyokimyasal yöntemlerle tanısı zordur. Bu nedenle, uygulanabilirlik, zaman ve maliyet açısından daha verimli yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *C. parapsilosis* tür kompleksine ve *L. elongisporus*'a ait izolatların ayırımında MALDI-TOF MS yönteminin tanı performansını değerlendirmektir.

**Yöntem:** Sunulan çalışmada, *C. parapsilosis* (n=8), *Candida orthopsilosis* (n=7), *Candida metapsilosis* (n=6) ve *L. elongisporus* (n=11) türlerini içeren toplam 32 referans izolat MALDI-TOF MS yöntemi ile identifiye edildi.

**Bulgular:** *Candida parapsilosis* tür kompleksine ve *L. elongisporus*'a ait 31 (%93.7) izolatın tür ismi doğru şekilde tanımlandı. Sekiz (%100) *C. parapsilosis*, 5 (%83) *C. metapsilosis*, 5 (%71) *C. orthopsilosis* ve 6 (%54) *L. elongisporus* izolatını içeren toplam 24 (%75) izolatın tür ismi 1.7–2.14 arasında değişen skor değerleri ile identifiye edildi. Güvenli tanımlama için  $\geq 1.7$  skoru referans alındığında, MALDI-TOF MS yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %54.5–100 ve %96.3–100 olarak belirlendi.

**Sonuç:** *Candida parapsilosis* tür kompleksi ve *L. elongisporus* gibi biyokimyasal yöntemlerle ayırımı güç olan türlerin hızlı moleküler fenotipik tanısında MALDI-TOF MS'in etkili bir yöntem olduğu gösterilmesine karşılık, daha güvenli skor aralıklarında tür düzeyinde tanımlama için yöntemin optimizasyonu ve daha geniş MS kütüphanesi gereksinimi olduğu açıktr.

**Anahtar kelimeler:** *Candida parapsilosis* tür kompleksi, *Lodderomyces elongisporus*, moleküler tanı, MALDI-TOF MS

### ABSTRACT

**Objective:** *Candida parapsilosis* species complex and *Lodderomyces elongisporus* may have differences in terms of their virulence, prevalence, and antifungal susceptibility profiles. These species are difficult to identify with biochemical methods. Therefore, there is a need for more efficient identification methods in terms of time, cost, and applicability. This study aims to evaluate the diagnostic performance of the MALDI-TOF MS method in discriminating between isolates belonging to the *C. parapsilosis* species complex and *L. elongisporus*.

**Method:** In the current study, a total of 32 reference strains, including the *C. parapsilosis* (n=8), *Candida orthopsilosis* (n=7), *Candida metapsilosis* (n=6), and *L. elongisporus* (n=11) species were identified using the MALDI-TOF MS method.

**Results:** The species names of 31 (93.7%) isolates belonging to the *C. parapsilosis* species complex and *L. elongisporus* were correctly identified. Twenty four isolates including eight (100%) *C. parapsilosis*, five (83%) *C. metapsilosis*, five (71%) *C. orthopsilosis*, and six (54%) *L. elongisporus* isolates were identified with score values ranging from 1.7 to 2.14. According to the secure identification reference score of  $\geq 1.7$ , the sensitivity and specificity of the MALDI-TOF MS method were determined as 54.5–100% and 96.3–100%, respectively.

**Conclusion:** Although the MALDI-TOF MS method has been shown to be effective in the rapid molecular phenotypic diagnosis of species that were difficult to discriminate using biochemical methods such as *C. parapsilosis* species complex and *L. elongisporus*, there is a clear need to optimize the method and develop a larger MS library for species-level identification within secure score ranges.

**Keywords:** *Candida parapsilosis* species complex, *Lodderomyces elongisporus*, Molecular Identification, MALDI-TOF MS

Alındığı tarih / Received:

09.06.2021 / 09.June.2021

Kabul tarihi / Accepted:

02.08.2021 / 02.August.2021

Erken çevrimiçi / First Published:

23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

E. Kaplan 0000-0001-5705-717X

A. S. Karakoyun 0000-0002-2717-6343

D. Alkaya 0000-0001-8580-4152

N. Ünal 0000-0001-5121-3100

A. Döğen 0000-0002-0388-306X

M. İlkit 0000-0002-1174-4182

✉ enginkaplan33@gmail.com

## GİRİŞ

*Candida* türleri invazif mantar hastalıklarının önemli etkenlerindedir<sup>(1)</sup>. Kandidemilerin tüm dünyadaki en sık etkeni *Candida albicans*'dır<sup>(2)</sup>. *Candida parapsilosis* ise yoğun bakım ünitelerinde ikinci veya üçüncü sırada yer alır<sup>(3)</sup>. Ülkemizde kandideminin en sık ikinci etkeni *C. parapsilosis* olup, insidansı her geçen gün artmaktadır<sup>(4)</sup>.

*Candida parapsilosis* tür kompleksi üyeleri, *C. albicans*, *Candida dubliniensis* ve *Lodderomyces elongisporus* ile aynı taksonomik grup içerisinde sınıflandırılır<sup>(5,6)</sup>. *C. parapsilosis* tür kompleksi *C. parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis* türlerini içerir<sup>(7)</sup> ve *L. elongisporus* türü ile yakından ilişkilidir<sup>(8-10)</sup>. Kriptik türler olmalarına karşılık, *L. elongisporus* ve tür kompleksi içerisindeki türlerin virülans, prevalans ve antifungal duyarlılık özellikleri açısından farklılıklar dikkat çekmiştir. *C. parapsilosis*, kompleks içerisinde en sık görülen tür iken, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* türlerinin prevalansı bölgesel olarak farklılık gösterebilmektedir<sup>(11)</sup>. Son zamanlarda, Ortadoğu<sup>(12,13)</sup>, İspanya<sup>(14)</sup> ve Japonya'da<sup>(15)</sup> *L. elongisporus* ile ilişkili enfeksiyonlar bildirilmiştir. *C. orthopsilosis*'in itrakonazol ve ekinokandin grubu ilaçlara en yüksek minimal inhibisyon konsantrasyonu gösterdiği<sup>(16)</sup>, *C. metapsilosis*'in ise ekinokandin grubu ilaçlara en duyarlı tür olduğu rapor edilmiştir<sup>(17)</sup>. *C. parapsilosis* ile karşılaştırıldığında, *L. elongisporus*'ta antifungal direnci daha düşük oranlarda bulunmuştur<sup>(12-15)</sup>. Ayrıca, *C. parapsilosis* pozitif kan izolatlarnın %9.5'inde *C. parapsilosis* ve *C. orthopsilosis*'in birlikte etken olduğu belirlenmiştir<sup>(18)</sup>.

*Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* ve *L. elongisporus* türlerinde görülebilen virülans, prevalans ve antifungal duyarlılık farklılıklarına karşılık, bu türlerin ayırıcı tanısı fenotipik yöntemlerle yapılamamaktadır. *C. parapsilosis* tür kompleksi ayırımında, sıklıkla ribozomal DNA'nın ITS (Internal transcribed spacer) bölgesinin sekansı veya sekonder alkol dehidrojenaz (*SADH*) geni kapsamında kesim enzimi temelli polimorfizm analizleri kullanılmasına karşılık, klinik tanı noktasında uygulanabilirlik, zaman ve maliyet açısından daha verimli yöntemlere gereksi-

nim duyulmaktadır.

Son 10 yıl içerisinde, matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) enfeksiyon etkeni maya mantarlarının tür tanısında hızlı ve uygulanabilirliği kolay bir yöntem olarak yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. MALDI-TOF-MS yönteminin, biyokimyasal yöntemlerle tanımlanabilen mantar türlerinin yanında, birbirine yakın türleri içeren tür kompleksi<sup>(19)</sup> veya varyete üyesi izolatlarnın ayırımında<sup>(20)</sup> veya antifungal duyarlılık analizlerinde<sup>(21-24)</sup> de kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, MALDI-TOF MS yönteminin *C. parapsilosis* tür kompleksi ve *L. elongisporus* izolatlarnın ayırıcı tanısındaki etkinliğini değerlendirilmesi ve verilerin literatür eşliğinde tartışılması amaçlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**İzolatlar:** Sunulan çalışmada, *L. elongisporus* (n=11) ve *C. parapsilosis* tür kompleksi üyesi *C. parapsilosis* (n=8), *C. orthopsilosis* (n=7) ve *C. metapsilosis* (n=6) türlerini temsil eden klinik ve çevresel kökenli toplam 32 referans izolat incelendi. *Candida* izolatlarnı CBS-KNAW Mantar Biyoçeşitlilik Merkezi (Westerdijk Mantar Biyoçeşitlilik Enstitüsü, Utrecht, Hollanda) ve *L. elongisporus* izolatlarnı ise Duke Üniversitesi Moleküler Genetik ve Mikrobiyoloji Departmanı (Durham, NC, ABD) koleksiyonundan alındı (Tablo 1). İzolatlar, Sabouraud glikoz agar (SGA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)'da 30°C'de 2 gün inkübe edilerek canlandırıldı.

**MALDI-TOF MS analizi:** Tanımlama için SGA plaklarında taze kültürden üretilen koloniler kullanıldı. Her bir izolattan kürdan yardımı ile MALDI hedef plak (MSP 96 BC ground steel target; Bruker Daltonik, Bremen, Almanya) üzerindeki noktalara, transfer yapıldı ve ince bir tabaka hâlinde sürüldü. Plaka üzerinde ekstraksiyon, her noktanın 1 µl %70'lik formik asit çözeltisi ile kaplanması ve örnek yüklü plakanın 5 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılması ile yapıldı. Sonra, örneklerin her biri 1 µl α-siyano-4-hidroksi sinamik asit solüsyonu (HCCA matriks;

**Tablo 1. Çalışmada incelenen *Candida parapsilosis* kompleks türleri ve *Lodderomyces elongisporus*'a ait kökenlerin özellikleri ve MALDI-TOF MS tanı sonuçları.**

Tür ismi	Suş ismi	Örnek Türü	Örnek Kökeni	İzolasyon	Ülke	MALDI-TOF MS Tanısı	Tanı Skorları
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 2915	Klinik	İnsan	-	Norveç	<i>C. parapsilosis</i>	1.703
	CBS 604	Klinik	İnsan	-	Porta Riko	<i>C. parapsilosis</i>	1.787
	CBS 7248	Klinik	Hayvan	Subklinik mastit	Yeni Zelanda	<i>C. parapsilosis</i>	1.937
	CBS 8836	Klinik	İnsan	Kan	ABD	<i>C. parapsilosis</i>	2.043
	CBS 12541	Çevresel	Meyve	Ziziphus mauritiana	Zimbabve	<i>C. parapsilosis</i>	1.877
	CBS 1954*	Çevresel	Meyve	-	İtalya	<i>C. parapsilosis</i>	2.001
	CBS 2216	Çevresel	Gıda	Salamura	ABD	<i>C. parapsilosis</i>	1.833
	CBS 8181	Çevresel	Bitki	Nothofagus dombeyii	Şili	<i>C. parapsilosis</i>	2.143
<i>Candida orthopsilosis</i>	CBS 10741	Klinik	İnsan	Tırnak	Belçika	<i>C. orthopsilosis</i>	1.453
	CBS 10742	Klinik	İnsan	Tırnak	Belçika	<i>C. orthopsilosis</i>	1.715
	CBS 10906*	Klinik	İnsan	Vajinal	ABD	<i>C. orthopsilosis</i>	1.516
	CBS 9894	Çevresel	Böcek	-	Panama	<i>C. orthopsilosis</i>	1.785
	CBS 10743	Çevresel	Böcek	-	ABD	<i>C. orthopsilosis</i>	1.896
	CBS 2212	Çevresel	Bitki	-	Endenozya	<i>C. orthopsilosis</i>	1.939
	CBS 8825	Çevresel	Bitki	-	Avustralya	<i>C. orthopsilosis</i>	1.851
<i>Candida metapsilosis</i>	CBS 10747	Klinik	İnsan	Tırnak	Belçika	<i>C. parapsilosis</i>	1.852
	CBS 10907*	Klinik	İnsan	-	ABD	<i>C. metapsilosis</i>	1.813
	CBS 2315	Klinik	İnsan	Balgam	İtalya	<i>C. metapsilosis</i>	1.812
	CBS 11127	-	-	-	-	<i>C. metapsilosis</i>	1.791
	CBS 2916	-	-	-	Norveç	<i>C. metapsilosis</i>	1.971
	CBS 10746	-	-	-	-	<i>C. metapsilosis</i>	1.742
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	7660	Klinik	-	-	Meksika	<i>L. elongisporus</i>	1.762
	7661	Klinik	-	-	Malezya	<i>L. elongisporus</i>	1.655
	7663	Klinik	-	-	ABD	<i>L. elongisporus</i>	1.821
	7665	Klinik	-	-	Venezüella	<i>L. elongisporus</i>	1.609
	7666	Klinik	-	-	Venezüella	<i>L. elongisporus</i>	1.668
	7668	Klinik	-	-	İtalya	<i>L. elongisporus</i>	1.770
	7669	Klinik	-	-	Meksika	<i>L. elongisporus</i>	1.871
	7670	Klinik	-	-	Meksika	<i>L. elongisporus</i>	1.701
	7672	Klinik	-	-	Meksika	<i>L. elongisporus</i>	1.809
	7673	Klinik	-	-	Meksika	<i>L. elongisporus</i>	1.698
	7675	Klinik	-	-	Meksika	<i>L. elongisporus</i>	1.565

Bruker) ile kaplandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma sonrası plaka MALDI-TOF kütle spektrometrisi cihazına (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) yüklendi. Cihaz kalibrasyonu ve pozitif kontrol olarak Bruker BTS solüsyonu kullanıldı. Kalite kontrolü ve her bir izolata ait spektrumların analizi için Bruker Biotyper 3.1 yazılım programı ve kütüphanesinden (versiyon 3.1.66) yararlanıldı. MALDI skorları üreticinin talimatlarına göre sınıflandırıldı; buna göre, 2.3–3 arası log-skor değeri yüksek doğrulukta tür düzeyinde tanı, 2–2.29 arası skor güvenli cins ve olası tür düzeyinde tanı, 1.7–1.99 arası olası cins düzeyinde tanı ve 0–1.69 arası skor ise güvenilir olmayan tanı şeklinde değerlendirildi.

MALDI-TOF MS yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü Blakely ve Salmond'a<sup>(25)</sup> göre hesaplandı.

## BULGULAR

Çalışmada belirlenen MALDI-TOF MS kütle spektrumları MSP kütüphanesi ile karşılaştırıldı. MALDI-TOF MS analizi sonucunda 31 (%93.7) izolatin tür ismi doğru şekilde saptandı, bir (%3.1) *C. metapsilosis* izolati ise yanlış tür ismi ile tanımlandı (Tablo 1). Skor değerleri, üç (%9.3) izolat için  $\geq 2.0$ , 21 (%65.6) izolat için 1.7–2.0 ve yedi (%21.8) izolat için ise  $< 1.7$  olarak belirlendi (Tablo 1 ve Tablo 2).

Sekiz (%100) *C. parapsilosis*, beş (%83) *C. metapsilosis*, beş (%71) *C. orthopsilosis* ve altı (%54) *L. elongisporus* izolatinı içeren toplam 24 (%75) izolat 1.7–2.14 arasında değişen skor değerleri ile tanımlandı. Buna karşılık, iki (%28.5) *C. orthopsilosis* ve beş (%45.4) *L. elongisporus* izolatinın tür ismi doğru ola-

Tablo 2. MALDI-TOF MS analiz skorları ve tanı performansı.

Türler	Tanı skorları*				Tanı performansı**		
	2.3-3.0	2.0-2.29	1.7-1.9	<1.7	Yalancı pozitiflik	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
<i>Candida parapsilosis</i> (n=8)	-	3	5	-	-	100	100
<i>Candida metapsilosis</i> (n=6)	-	-	5	-	<i>C. parapsilosis</i> (n=1)	100	96.3
<i>Candida orthopsilosis</i> (n=7)	-	-	5	2	-	71.4	100
<i>Lodderomyces elongisporus</i> (n=11)	-	-	6	5	-	54.3	100

\* 2.3–3, yüksek doğrulukta tür düzeyinde tanı; 2–2.29, güvenli cins ve olası tür düzeyinde tanı; 1.7–1.99, olası cins düzeyinde tanı; 0–1.69, güvenilir olmayan tanı

\*\*  $\geq 1.7$  skorla tanımlanmış izolatlar temel alındı.

rak belirlenmesine karşılık, güvenli olmayan skor aralığında belirlendi (skor  $<1.7$ ) ve bir (%16.6) *C. metapsilosis* izolatı ise *C. parapsilosis* olarak yanlış tanımlandı (Tablo 1 ve 2).

Güvenli tanımlama için  $\geq 1.7$  skoru temel alındığında, *C. parapsilosis* tür kompleksine ait izolatların ayırımında, MALDI-TOF MS yönteminin duyarlılığı *C. parapsilosis* ve *C. metapsilosis* için %100, *C. orthopsilosis* ve *L. elongisporus* için ise sırasıyla %71.4 ve %54.5 olarak saptandı. Yöntemin özgüllüğü ise *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *L. elongisporus* için %100 ve *C. metapsilosis* için %96.3 olarak belirlendi (Tablo 2).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, *L. elongisporus* ve *C. parapsilosis* tür kompleksi üyesi izolatların ayırımında MALDI-TOF MS yönteminin performansı değerlendirildi. Bu amaçla, 32 referans *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* ve *L. elongisporus* izolatı MALDI-TOF MS yöntemi ile incelendi ve %54.5–%100 duyarlılık ve %96.3–%100 özgüllük oranları ile ayırımının yapılabildiği gösterildi. Bu durum, moleküler temelli yöntemlerin halihazırda daha doğru ve güvenilir olduğuna işaret etmektedir.

MALDI-TOF MS yöntemi, bakteri ve maya mantarı izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması için son yıllarda birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarınca rutin olarak kullanılan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir<sup>(26)</sup>.

Klasik maya mantarı tanı sistemleri ile karşılaştırıldığında, MALDI-TOF MS yöntemi zaman, uygulama kolaylığı ve performans temelinde önemli avantajlara sahiptir. Buna karşılık, MALDI-TOF MS temelli yanlış identifikasyon hemen daima birincil olarak sınırlı referans suş verisine sahip kütüphaneler ile ilişkilendirilmektedir<sup>(27)</sup>. MALDI-TOF MS yöntemi maya mantarlarının rutin tanısında kullanılmasına karşılık, özellikle tür kompleksi izolatlarının tanısında spesifik örnek hazırlama protokollerine ve daha geniş MS veri kütüphanelerine gereksinim duyulabilmektedir<sup>(28,29)</sup>.

Klinik öneme sahip ve tanısı zor olan kriptomatik mantar türlerinin ayırımında MALDI-TOF MS yönteminin uygulanabilirliği bulgularımızla uyumlu olarak diğer çalışmalarda da rapor edilmiştir. Literatürde, Arastehfar ve ark.<sup>(11)</sup>, MALDI-TOF MS temelli *C. parapsilosis* tür kompleksi izolat tanılarının, DNA temelli tanı yöntemleriyle (rDNA sekanslama ve genotipleme) uyumlu olduğunu rapor etmişlerdir. De Carolis ve ark.'nın<sup>(8)</sup> *L. elongisporus* ve *C. parapsilosis* tür kompleksi üyesi toplam 36 izolatı incelediği çalışmada, MALDI-TOF MS yönteminin tüm türleri doğru tanımladığı (skor  $\geq 2.0$ ), ayrıca DNA ve kütle spektrum verileri temelli filogenetik analizlerde izolatların benzer şekilde kümelenildiği bildirilmiştir. Roberto ve ark.<sup>(30)</sup> ise *C. parapsilosis* tür kompleks izolatlarının ekinokandin ilaç direnç profillerinin belirlenmesinde, MALDI-TOF MS'nin optimize yöntemlerle yüksek doğrulukta veri sağlayabildiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, *L. elongisporus* ve *C. parapsilosis* tür kompleksinin hızlı tanısında MALDI-TOF MS yönteminin uygulanabilirliği gösterilmiştir. Buna karşılık, kriptik türlerin güvenli skor aralıklarında tanısı için yöntem optimizasyonu ve standart MS kütüphanesine ek olarak, laboratuvar içi referans suş MS kütüphanesine gereksinim olabileceği belirlenmiştir. Analiz edilen izolat sayısının görece az olması bu çalışmanın bir eksikliği olabileceği düşünüldü. Gelecekte MALDI-TOF MS yönteminin multipleks tanı performansının değerlendirilmesi kuşkusuz ilgi çekici olacaktır.

### Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan *Candida* suşlarını sağlayan Prof. Dr. Sybren de Hoog (Radboud Üniversitesi, Tıp Merkezi, Nijmegen, Hollanda)'a ve *Lodderomyces elongisporus* suşlarını sağlayan Prof. Dr. Joseph Heitman (Moleküler Genetik ve Mikrobiyoloji Departmanı, Duke Üniversitesi)'a teşekkürlerimizi sunarız.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

### KAYNAKLAR

1. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. Nat. Rev. Dis. Primers. 2018;4:18026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
2. 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>
3. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Hagen F, Meis JF, Khan Z. High-resolution fingerprinting of *Candida parapsilosis* isolates suggests persistence and transmission of infections among neonatal intensive care unit patients in Kuwait. Sci Rep. 2019;9(1):1340. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37855-2>
4. Arastehfar A, Hilmioğlu-Polat S, Daneshnia F, et al.

Clonal Candidemia Outbreak by *Candida parapsilosis* Carrying Y132F in Turkey: Evolution of a Persisting Challenge. Front Cell Infect Microbiol. 2021; 11:676177.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.676177>

5. van der Walt JP. *Lodderomyces*, a new genus of the Saccharomycetaceae. Antonie van Leeuwenhoek. 1966; 32:1-5. <https://doi.org/10.1007/BF02097439>
6. Diezmann S, Cox CJ, Schönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5624-35. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5624-5635.2004>
7. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005;43(1):284-92. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
8. De Carolis E, Hensgens LA, Vella A, et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. Med Mycol. 2014;52(2):123-30. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt009>
9. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2008;46(8):2659-64. <https://doi.org/10.1128/JCM.00803-08>
10. Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. PLoS One. 2012;7(4): e35750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035750>
11. Arastehfar A, Khodavaisy S, Daneshnia F, et al. Molecular identification, genotypic diversity, antifungal susceptibility, and clinical outcomes of infections caused by clinically underrated yeasts, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*: An Iranian multicenter study (2014-2019). Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9:264. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00264>
12. Ahmad S, Khan ZU, Johny M, et al. Isolation of *Lodderomyces elongisporus* from the catheter tip of a fungemia patient in the Middle East. Case Rep Med. 2013; 2013:560406. <https://doi.org/10.1155/2013/560406>
13. Taj-Aldeen SJ, AbdulWahab A, Kolecka A, Deshmukh A, Meis JF, Boekhout T. Uncommon opportunistic yeast bloodstream infections from Qatar. Med Mycol. 2014;52(5):552-6.

- <https://doi.org/10.1093/mmycol/myu016>
14. Fernández-Ruiz M, Guinea J, Puig-Asensio M, et al. Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain. *Med Mycol*. 2017;55(2):125-36.  
<https://doi.org/10.1093/mmy/myw055>
  15. Hatanaka S, Nakamura I, Fukushima S, Ohkusu K, Matsumoto T. Catheter-related bloodstream infection due to *Lodderomyces elongisporus*. *Jpn J Infect Dis*. 2016;69(6):520-2.  
<https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.182>
  16. Vigezzi C, Icely PA, Dudiuk C, et al. Frequency, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* species complex isolated from patients with candidemia in the central region of Argentina. *J Mycol Med*. 2019;29(4):285-91.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100907>
  17. Gil-Alonso S, Quindós G, Cantón E, Eraso E, Jauregizar N. Killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* species complex: Evaluation of the fungicidal activity. *Rev Iberoam Micol*. 2019;36(1):24-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.12.001>
  18. Barbedo LS, Vaz C, Pais C, et al. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. *J Med Microbiol*. 2015;64(1):7-17.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.080655-0>
  19. Özhak-Baysan B, Ögünç D, Döğen A, Ilkit M, de Hoog GS. MALDI-TOF MS-based identification of black yeasts of the genus *Exophiala*. *Med Mycol*. 2015;53(4):347-52.  
<https://doi.org/10.1093/mmy/myu093>
  20. Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS One*. 2012;7(5): e37566.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037566>
  21. Delavy M, Dos Santos AR, Heiman CM, Coste AT. Investigating antifungal susceptibility in *Candida* species with MALDI-TOF MS-based assays. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9:19.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00019>
  22. Vatanshenassan M, Boekhout T, Meis JF, et al. *Candida auris* identification and rapid antifungal susceptibility testing against echinocandins by MALDI-TOF MS. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9:20.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00020>
  23. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, et al. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(9):2964-9.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00903-13>
  24. Knoll MA, Ulmer H, Lass-Flörl C. Rapid antifungal susceptibility testing of yeasts and molds by MALDI-TOF MS: A systematic review and meta-analysis. *J Fungi*. 2021;7(1):63.  
<https://doi.org/10.3390/jof7010063>
  25. Blakely T, Salmond C. Probabilistic record linkage and a method to calculate the positive predictive value. *Int J Epidemiol*. 2002;31(6):1246-52.  
<https://doi.org/10.1093/ije/31.6.1246>
  26. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):475-84.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x>
  27. Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules*. 2020;25(20): 4775.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25204775>
  28. Haas M, Grenouillet F, Loubersac S, et al. Identification of cryptic *Candida* species by MALDI-TOF mass spectrometry, not all MALDI-TOF systems are the same: focus on the *C. parapsilosis* species complex. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(4):385-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.028>
  29. Sow D, Fall B, Ndiaye M, et al. Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. *Mycopathologia*. 2015;180(3-4):173-9.  
<https://doi.org/10.1007/s11046-015-9905-2>
  30. Roberto AEM, Xavier DE., Vidal EE, Vidal CFL, Neves RP, Lima-Neto RG. Rapid detection of echinocandins resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* complex. *Microorganisms*. 2020;8(1):109.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010109>



# Hidrojel ve Silikon Hidrojel Kontakt Lens Kullanımı ile Konjonktivadaki Koagülaz Negatif Stafilokok Popülasyonu ve Biyofilm Oluşturan *Staphylococcus epidermidis* Arasındaki İlişki

## *The Relationship Between the Use of Hydrogel and Silicone Hydrogel Contact Lenses and Coagulase-Negative Staphylococci Population in the Conjunctiva and Biofilm Forming Staphylococcus epidermidis*

Zeynep Güngördü Dalar\*<sup>Ⓜ</sup>, Güzin İskeleli\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Mert Ahmet Kuşkuçcu\*<sup>Ⓜ</sup>, Mehmet Demirci\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Penbe Çağatay\*\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Sevgi Ergin\*<sup>Ⓜ</sup>, Aysel Karataş\*\*\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Barış Ata Borsa\*\*\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Zeynep Taner\*<sup>Ⓜ</sup>, Süleyman Pelit\*\*\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Müzeyyen Mamal Torun\*\*\*\*\*<sup>Ⓜ</sup>, Arif Kaygusuz\*<sup>Ⓜ</sup>, Kenan Midilli\*<sup>Ⓜ</sup>, Bekir S. Kocazeybek\*<sup>Ⓜ</sup>, Hrisi Bahar Tokman\*<sup>Ⓜ</sup>

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

\*\* İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

\*\*\* Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırklareli, Türkiye

\*\*\*\* Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

\*\*\*\*\* İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

\*\*\*\*\* Linköping University, Department of Physics Chemistry and Biology, Division of Molecular Surface Physics and Nanoscience,

Linköping, İsveç

\*\*\*\*\* Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

\*\*\*\*\* Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Atf/Cite as:** Güngördü Dalar Z, İskeleli G, Kuşkuçcu MA, Demirci M, Çağatay P, Ergin S, et al. Hidrojel ve silikon hidrojel kontakt lens kullanımı ile konjonktivadaki koagülaz negatif stafilokok popülasyonu ve biyofilm oluşturan *Staphylococcus epidermidis* arasındaki ilişki, Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Derg. 2021;51(4):406-14.

### Öz

**Amaç:** Konjonktiva mikrobiyotasında kolonize olan en önemli bakteriler *Staphylococcus epidermidis*, difteroid çomaklar, *Corynebacterium* spp. ve *Cutibacterium acnes*'tir. Özellikle *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturmaya hazır olan kontakt lense bağlı enfeksiyonların gelişiminde önem taşımaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, lens kullanmaya hazırlanan 140 hastanın (90 hidrojel, 50 silikon hidrojel), lens kullanımından önce ve sonra alınan konjonktiva sürüntülerinde biyofilm oluşturan *S. epidermidis* ve diğer koagülaz negatif stafilokok türlerinin varlığındaki değişimleri incelemeyi amaçladık.

**Yöntem:** İzole edilen koagülaz negatif stafilokoklar standart klinik mikrobiyolojik yöntemlerle, *S. epidermidis* türleri API Staph ile tanımlandıktan sonra slime üretimleri; Kongo kırmızılı agar, standart tüp ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir.

**Bulgular:** *S. epidermidis*, lens kullanım öncesi ve sonrası konjonktival mikrobiyotada en sık izole edilen tür olmuştur. Lens kullanım öncesi konjonktiva mikrobiyotasında slime üreten *S. epidermidis* oranları %45-50 iken, hidrojel kontakt lens kullanım sonrası %59, silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası ise %70.2 olarak belirlenmiştir. Slime üretiminin araştırılması için, 161 *S. epidermidis* kökeninin Kongo Kırmızılı Agar besiyeri kullanılarak yapılan değerlendirilmesinde, 82'si (%50.9), standart tüp yöntemiyle 61'i (%37.8), moleküler yöntemlerle 91'i (%56.5) pozitif bulunmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonucu, lens kullanım öncesi ve sonrası bakteri oranlarında anlamlı değişimlerin olmadığı ama özellikle *S. epidermidis* gibi bakterilerin, slime üretimiyle kontakt lens faktörünün de kullanarak enfeksiyonlara zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca; moleküler yöntemlerin ve Kongo Kırmızılı Agar yönteminin, Standart Tüp yöntemine göre daha güvenilir olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kontakt lens, konjonktival mikrobiyota, biyofilm

### ABSTRACT

**Objective:** The most important bacteria of the conjunctival microbiota are *Staphylococcus epidermidis*, diptheroid rods, *Corynebacterium* spp. and *Cutibacterium acnes*. Especially biofilm formation of *S. epidermidis* is very important for contact lens related infections. For this purpose, we aimed to examine the changes in the presence of biofilm-forming *S. epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci in conjunctival swabs taken before and after lens usage in 140 patients (90 hydrogel, 50 silicone hydrogel) who were prepared to wear lenses.

**Methods:** Coagulase-negative staphylococci isolated from the conjunctival microbiota identified standard clinical microbiological methods, after identification of *S. epidermidis* strains with API Staph; Slime production was determined by Congo red agar, standard tube and molecular methods.

**Results:** *S. epidermidis* was the most frequently isolated species in conjunctival microbiota before and after lens usage. Before lens usage, slime positive *S. epidermidis* strains were found as 45-50% but after lens usage it was 59% in hydrogel contact lens users and 70.2% in silicone hydrogel contact lens users. For the investigation of slime production, 82 (50.9%) of 161 *S. epidermidis* strains were found positive by using Congo red agar, 61 (37.8%) by standard tube method and 91 (56.5%) by molecular methods.

**Conclusion:** The result of our study suggests that there are no significant changes in bacterial ratios before and after lens use, but bacteria such as *S. epidermidis* can predispose to infections by using slime production and contact lens factor. Also; molecular methods and Congo Red Agar method were found to be more reliable than the Standard Tube method.

**Keywords:** Contact lenses, conjunctival microbiota, biofilm

**Alındığı tarih / Received:**  
09.06.2021 / 09.June.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
02.08.2021 / 02.August.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

Z. G. Dalar 0000-0003-2177-4235  
G. İskeleli 0000-0001-9253-7646  
M. A. Kuşkuçcu 0000-0001-8735-5725  
M. Demirci 0000-0001-9670-2426  
P. Çağatay 0000-0002-0058-4152  
S. Ergin 0000-0003-2039-3078  
A. Karataş 0000-0001-8916-8499  
B. A. Borsa 0000-0003-4285-2933  
Z. Taner 0000-0003-0336-1832  
S. Pelit 0000-0002-0028-4264  
M. Mamal Torun 0000-0002-8510-3206  
A. Kaygusuz 0000-0002-1404-1933  
K. Midilli 0000-0003-3007-3422  
B. S. Kocazeybek 0000-0003-1072-3846  
H. B. Tokman 0000-0002-2205-5120

✉ hrisibahar@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

Konjonktiva mikrobiyotası doğumdan itibaren oluşmakta ve göz yüzeyinin korunmasında yer alan savunma mekanizmaları arasında bu mikrobiyotanın önemli rolü olduğu bilinmektedir<sup>(1)</sup>. Konjonktiva mikrobiyotasında en yoğun kolonize olan bakteri *Staphylococcus epidermidis* olmakla beraber bunu *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp. ve anaerob bakterilerden *Cutibacterium acnes*'in izlediği gösterilmiştir<sup>(2)</sup>. Son yıllarda tıbbi alanda gelişen uygulamalara paralel olarak, görme bozuklukları için geliştirilen kontakt lensler, oldukça yaygın kullanım alanına sahip biyomateriyallerdir. Ancak bunların, konjonktiva epitelinde mikrotravmalar oluşturarak, gözün fiziksel savunmasında zayıflamalara neden oldukları ve bu durumun başta *S. epidermidis* olmak üzere konjonktivadaki mikrobiyotayı etkileyerek bir yandan potansiyel patojen bakterilerin göz yüzeyine tutunmasına, diğer yandan normal konjonktival mikrobiyotanın parçası olan gerek *S. epidermidis*'in, gerekse diğer koagülaz negatif stafilokokların (KNS), korneaya ulaşarak enfeksiyona neden olmalarına zemin oluşturduğu da bilinmektedir<sup>(3,4)</sup>. Özellikle slime üreten mikroorganizmalarla kolonize olan bu biyomateriyallerin, mikrobiyal keratitlere kaynak oluşturduğu gösterildikten sonra, kontakt lens yüzeylerine yapışan ve biyofilm oluşturabilen mikroorganizmaların göz enfeksiyonlarındaki önemi daha iyi kavranmıştır<sup>(5,6)</sup>. Sankaridurg ve ark.'nın<sup>(7)</sup>, kontakt lens kullanımına bağlı olarak konjonktiva mikrobiyotasında biyofilm oluşturma özelliğine sahip *S. epidermidis*'in ve *C. acnes*'in kolonizasyonunda artış görülmesine, buna karşın bakteri türlerinin çeşitliliği bakımından bir artış görülmemesine dayanan çalışma bulguları, bu konuyu destekleyen iyi bir örnektir. *S. epidermidis*'te, biyofilm oluşumundan icaADBC operonunun ürünü olan polisakkarit yapıda hücrelerarası adezin (polysaccharide intercellular adhesin, PIA) sorumlu tutulmaktadır. IcaADBC operonu stafilokoklarda biyofilm oluşumunun hücrelerarası adezyon kısmında görev yapan PIA'nın oluşumunda yer alan poli-N-asetil-beta-1-6-glukozamin (PNAG) oligomerlerini sentezlettirir. *IcaA* ve *icaD* genlerinin görevi üridin difosfo (UDP)-N-asetil glukozamini substrat olarak kullanarak şeker oligomerleri sentezlettir-

mektir. *IcaA* tek başına düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi gösterirken, *icaD* geni varlığında enzim aktivitesinde belirgin artış gösterilmiştir. Bu nedenle *icaA* ve *icaD* genlerinin saptandığı *S. epidermidis* kökenlerinin güçlü bir biyofilm oluşturma potansiyeline sahip oldukları kabul edilmektedir<sup>(8)</sup>.

Görme bozukluklarında en sık kullanılan kontakt lensler, hidrofilik monomerlerin polimerizasyonu veya kopolimerizasyonu ile elde edilen ve genellikle sentetik yapıda olan yumuşak kontakt lenslerdir. Bu lenslerin hidrojel yapıda olanlarında, değişik oranlarda su tutma potansiyeli en önemli özellik olarak belirtilmekte ve bunun, materyalin oksijen geçirgenliği, elastikliği, ışığı kırma gücü ve gerilmeye karşı dayanıklılığında rol oynadığı bildirilmektedir<sup>(9)</sup>. Son yıllarda, silikonun yüksek oksijen geçirme özelliğiyle hidrojinin yüksek su ve oksijen taşıma özelliğinin kombine edilmesi ile, silikon ve hidrojel materyallerinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen Silikon-Hidrojel yapıda yumuşak kontakt lenslerin de yaygın bir kullanım alanına sahip olduğu ifade edilmektedir<sup>(10)</sup>.

Ülkemizde Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin 2018 yılında yaptığı sağlık araştırmasına göre, 15 yaş ve üzeri bireylerin gözlük veya kontakt lens kullanımlarının nüfusa oranının %35.6 olduğunu bildirilmiştir<sup>(11)</sup>. Ülkemizde yapılan bir çalışmada mikrobiyal keratit tanısı almış hastaların kültürlerinden etken olarak en sık *S. epidermidis*'in (%19.2) izole edildiği belirtilmiş, korneal ülser zemin oluşturabilecek kontakt lens kullanımının %43.1'lik bir oranla en sık karşılaşılan neden olduğu bildirilmiştir<sup>(12)</sup>.

Araştırdığımız kadarıyla ülkemizde alanında ilk olduğunu gördüğümüz bu çalışmada: (1) Konjonktiva mikrobiyotasında *icaA* ve *icaD* genlerine sahip *S. epidermidis* ve diğer KNS'ların dağılımının belirlenmesi, (2) Hidrojel kontakt lens ile silikon hidrojel kontakt lens kullanımının bu türlerin konjonktivadaki dağılımına etkisinin araştırılması, (3) *S. epidermidis* kökenlerinde slime üretiminin Kongo kırmızılı agar (KKA), standart tüp (ST) ve Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemleriyle araştırılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi), Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (2010-20669) onaylanmıştır.

**Örneklerin toplanması:** İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Kontakt Lens Birimi'ne başvurmuş ve yumuşak kontakt lens kullanmasına karar verilmiş, 88'i kadın 52'si erkek, kadınların yaş ortalaması  $22\pm 3$ , erkeklerin yaş ortalaması  $25\pm 3$  olan 140 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalardan 90'ının hidrojel kontakt lens, 50'sinin ise silikon hidrojel kontakt lens kullanması ve sık değişim programına uygun olarak bu lensleri, 30 gün sonra değiştirmeleri planlandı. Konjunktiva sürüntüleri, lenslerin hastaya ilk defa takılacağı gün, lens takılmadan önce, topikal anestezi madde kullanılmadan, kirpiklere ve göz kapaklarına değdirilmemeye özen gösterilerek, rastgele seçilen yalnızca tek bir gözün alt konjunktival forniksinden üç ayrı steril eküvyonla alındı ve sürüntülerin alındığı göz kaydedildi. Aylık sık değişimli lens kullanım programına tabi olan bu hastalar lenslerini çıkarıp atacakları ve yeni lens alacakları bir aylık dönem sonunda çağrıldı. Kontakt lensleri çıkarılan bu hastaların konjunktiva sürüntüleri, ilk sürüntülerin alındığı aynı gözün konjunktival fornikslerinden, üç ayrı eküvyonla tekrar alındı. Lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası dönemde konjunktiva sürüntüleri alınacak olan tüm hastaların konjunktivit veya başka bir göz enfeksiyonu tanısı almamış olmasına ve son 72 saat içinde antibiyotik kullanmamış olmasına dikkat edildi.

**Bakterilerin üretilmesi ve tanımlanması:** Lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası, hasta başında alınan konjunktiva sürüntüleri hiç bekletilmeden Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarları'na getirildi. Sürüntülerin alındığı eküvyonlardan biri ile hazırlanan direkt preparatlar Gram boyası ile boyanarak değerlendirilmiştir. İkinci eküvyon ile %5 koyun kanlı agara ve çikolatamsı agara ekimler yapıldı. Üçüncü eküvyon ise az sayıda bulunabilecek KNS türlerinin çoğalması için tiyoglikolatlı sıvı besiyerine ekildi ve besiyerleri  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24–48 saat inkübe edil-

di. İnkübasyon süresi sonunda öncelikle tiyoglikolatlı sıvı besiyerinden çikolatamsı agara pasajlar alındı ve bu besiyerleri  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edildi. Tiyoglikolatlı sıvı besiyerinden çikolatamsı agara alınan pasajlarda üreyen KNS türlerinin, %5 koyun kanlı agarda ve çikolatamsı agarda üreyen KNS türlerinden farklı olmadığı gözlemlendi. Her bir konjunktiva sürüntüsünün ekildiği kanlı ve çikolatamsı agarlarda, ayrıca tiyoglikolatlı sıvı besiyerinden pasaj alınan çikolatamsı agarda üreyen farklı morfolojideki koloniler numaralandırıldı ve her birinden Gram preparasyonlar hazırlandı. Gram pozitif diplokok görünümünde olan bakterilere ait benzer morfolojide gözükten kolonilerden katalaz testi yapıldı ve her bir besiyerinden ayrı ayrı katalaz pozitif olan en az 10 koloni pasaj alınarak çoğaltıldı. Çoğaltılan her bir köken için lamda kümeleyici faktör varlığı, DNaz ve tüpte koagülaz enzimi aktivitesi, 0.04 U basitrasin ve  $5\ \mu\text{g}$ 'lık novobiosin disklerine olan duyarlılık araştırıldı. Bağlı koagülaz "clumping factor" negatif, tüpte koagülaz enzimi aktivitesi negatif ve basitrasine dirençli olan kökenler KNS olarak isimlendirildi. Tüm KNS kökenlerinin tür tanımı API Staph (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kiti ile belirlendi. API Staph kiti ile *S. epidermidis* olduğu belirlenen KNS kökenleri triptik soy agar besiyerine ekilerek  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edildi ve biyofilm oluşumunda önemli rolü olan *icaA*, *icaD* genlerinin araştırılması aşamasına kadar %10 gliserollü brusella sıvı besiyerinde  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

***Staphylococcus epidermidis* kökenlerinde slime üretiminin araştırılması:** *S. epidermidis* kökenlerinde slime üretimi, Freeman ve ark.'nın<sup>(13)</sup> tanımladığı Kongo Kırmızılı Agar (KKA) ve Christensen ve ark.'nın<sup>(14)</sup> tanımladığı standart tüp yöntemiyle (ST) araştırıldı. Deneylerde pozitif kontrol olarak slime üreten *S. epidermidis* standart kökeni ATCC 35984 ve negatif kontrol olarak slime üretmeyen *S. epidermidis* standart kökeni ATCC 12228 kullanıldı.

**Kongo Kırmızılı Agar (KKA) yöntemi:** İzole edilen her bir *S. epidermidis* kökenininin 24 saatlik kültürlerinden KKA besiyerine pasajlar alındı. KKA, laboratuvarımızda Brain Heart Infusion agara (37 g/L, Himedia), sükröz (50 g/L, Merck) ve Kongo kırmızısı (0.8 g/L, Merck) ilave edilerek hazırlandı. KKA besiyerinde

35°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda, pembemsi-kırmızı, düz ve merkezi koyu renkli koloni yapan stafilkok kökenleri slime negatif, siyah, pürüzlü, kuru koloni yapan stafilkok kökenleri ise slime pozitif olarak değerlendirildi<sup>(13)</sup>.

**Standart Tüp (ST) yöntemi:** İzole edilen her bir *S. epidermidis* kökeninin 24 saatlik kültürlerinden %0.25 glukozlu trypticase soy buyyon (TSB) içeren tüplere ekimler yapılarak, 0.5 McFarland bulanıklığında bir süspansiyon hazırlandı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüplerin içerikleri boşaltıldı ve tüplere 5 ml %25'lik safranin boyası konuldu. Tüpler dikkatlice çalkalanarak boyanın tüm yüzeye teması sağlandı ve iki dakika beklendikten sonra, iki kez PBS ile yıkandı, havada kurutulduktan sonra ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde beklendi. Tüpün iç çeperinde safranin boyası sayesinde pembe boyanan ince film tabakasının görülmesi, slime üretimi olarak değerlendirildi<sup>(14)</sup>.

**Staphylococcus epidermidis kökenlerinden DNA izolasyonu:** *S. epidermidis* kökenlerinin DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. DNA izolasyonu yapılacak olan kökenlerin 18-24 saatlik taze pasajlarından alınan koloniler bir ml PBS tamponu ile homojenize edilerek 1 McFarland bulanıklığa göre ayarlandı, süspansiyonlar 11000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları atıldıktan sonra kalan pellete, 200 µl Tissue Lysis Buffer ilave edildi. Daha sonra 40 µl Proteinaz K eklenip vorteksenerek örnekler 55°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvılara 200 µl Binding Buffer eklenerek karıştırıldı. Karışım 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 100 µl isopropanol ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Örneklerin sıvı kısımları, koleksiyon tüplerinin üzerine konulan Spin kolonlara steril uçlar ile otomatik pipet yardımıyla aktarıldı. Bir dakika süresince 8000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, spin kolon yeni bir koleksiyon tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer ilave edildi. Bir dk süre ile 8000xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra spin kolonlar yeni koleksiyon tüplerine alındı ve üzerine 500 µl Wash Buffer ilave

edildi. Bir dk süre ile 8000xg'de santrifüj edildi bu işlem iki kere yapıldı. Spin kolonlar 10 saniye süre ile maksimum hızda (13000xg) tekrar santrifüj edilerek kalan etanol rezidüvleri uçuruldu. Koleksiyon tüpleri atıldı. DNA'yı toplamak amacıyla spin kolonlar temiz, steril, DNaz, RNaz içermeyen, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Önceden 70°C'de ısıtılmış 200 µl Elution Buffer, spin kolonlara ilave edilerek bir dk 8000xg'de santrifüj edildi böylece genomun membrandan ayrılması sağlandı. PZR işlemi yapılmaya kadar örnekler -20°C'de saklandı.

**Multipleks PZR ile *icaA* ve *icaD* genlerinin belirlenmesi:** Çalışmamızda *icaA* ve *icaD* genlerini araştırmak için Arciola CR ark.'nın<sup>(15)</sup> belirlemiş olduğu primerler kullanıldı (Tablo 1).

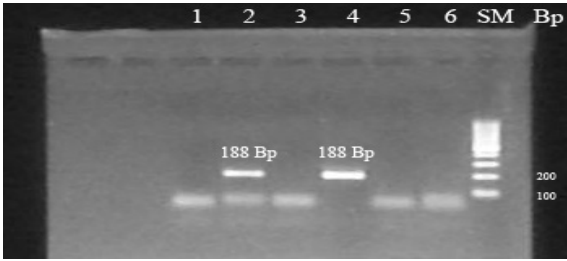
**Tablo 1. Multipleks PZR'nda kullanılan primer dizileri ve beklenen bant büyüklükleri.**

Gen	Yönü	Dizisi	Ürün boyutu
<i>icaA</i>	düz	5'-TCTCTTGACAGGAGCAATCAA-3'	188 bp
	ters	5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3'	
<i>icaD</i>	düz	5'-ATGGTCAAGCCAGACAGAG-3'	198 bp
	ters	5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'	

İzole edilen DNA'larda *icaA* ve *icaD* genlerinin tespiti tek aşamalı PZR ile araştırıldı. Amplifikasyon, PTC-200 Peltier Thermal Cycler'da gerçekleştirildi (MJ Research, Inc., MA, ABD). Her bir köken için reaksiyon hacminin beş µl'si DNA ekstraktı olmak üzere toplam hacim 50 µl olacak şekilde *icaA* ve *icaD* genleri için ayrı ayrı PZR karışımı hazırlandı. Her bir tüp üzerine birer damla mineral yağı eklendi. Bu işlem

**Tablo 2. Multipleks PZR ile *icaA* ve *icaD* genlerinin amplifikasyonu için uygulanan Thermal Cycler programı.**

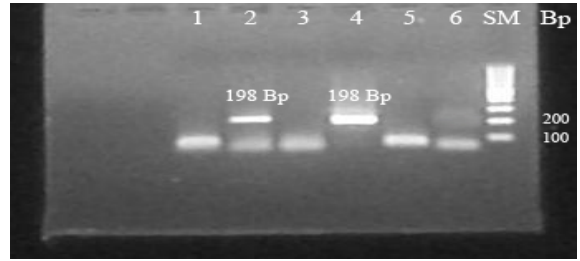
Aşama	Isı / Süre	Tanım
1. Bekleme	94°C / 5 dk	Denatürasyon
2. PZR (50 Döngü)	94°C / 1 dk 53°C / 1 dk 72°C / 1 dk	PZR ile Çoğaltma
3. Bekleme	72°C / 5 dk	Uzaması tamamlanmamış ürünlerin tamamlanması
4. Bekleme	4°C / Sonsuz	Yürütme aşamasına kadar saklamak için



**Şekil 1.** Multipleks PZR ile saptanan *icaA* geninin agaroz jeldeki görünümü.

(SM: Size marker, 2-4 pozitif örnekler, 1-3-5 negatif örnekler, DNA ladder: 100 kb)

\* *icaA* geni için PZR sonrası; 188-bp'de bantlar izlendi.



**Şekil 2.** Multipleks PZR ile saptanan *icaD* geninin agaroz jeldeki görünümü

(SM: Size marker, 2-4 pozitif örnekler, 1-3-5 negatif örnekler, DNA ladder: 100 kb)

\* *icaD* geni için PZR sonrası; 198-bp'de bantlar izlendi.

sonrasında tüplerin kapağı kapatılarak örnekler Thermal Cycler'a yerleştirildi ve Tablo 2'de belirtilen PZR programı uygulandı.

Amplifikasyon sonrası PZR ürünleri yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bu amaçla her yürütülen ürün grubunda elde edilen bantların büyüklüğünü karşılaştırmak için 100 bp'lik (bp: base pair (baz çifti)) size marker (Fermentas®, Litvanya) kullanıldı. 100 V'da 20-25 dakika (Minnie.The.Gel.CicleHE 33, Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco, ABD) yürütüldükten sonra UV - translüminatör (Model Tuv 20 Owl Scientific, ABD) altında incelendi ve araştırılan bantlar değerlendirilerek pozitif örneklerin fotoğrafları çekildi (Kodak 1D 3.5) (Şekil 1, 2).

**İstatistik analiz:** Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Mc Nemar testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Kullanılan kontakt lens türüne bakılmaksızın, kontakt lens kullanan toplam 140 hastamızın, lens kullanmaya başlamadan önce alınan konjonktiva sürüntülerinden 81 (%57.8) KNS kökeni üretilmiştir. KNS'lardan *S. epidermidis* %88.9 oranıyla en sık izole edilen tür olmuştur. Diğer KNS türleri sırasıyla yedi (%8.65) *Staphylococcus lugdunensis*, iki (%2.45) *Staphylococcus capitis* olarak tanımlanmıştır. Buna karşın kontakt lens kullanım sonrası toplam 140 hastamızın konjonktiva sürüntülerinden 109 (%77.8) KNS kökeni üretilmiştir. Çalışmada her hasta için lens kullanım sonrası üretilen KNS türlerinin lens kullanım

öncesi üretilen türlerle benzerliği moleküler yöntemlerle araştırılmaksızın lens kullanımına bağlı olarak konjonktiva mikrobiyotasında *icaA* ve *icaD* genlerine sahip *S. epidermidis* ve diğer KNS türlerinin dağılımında bir değişiklik olup olmadığı araştırılmış ve lens kullanım sonrası üretilen KNS türlerinin 89'u (%81.6) *S. epidermidis*, 15'i (%13.76) *S. lugdunensis*, üçü (%2.75) *Staphylococcus caprae* ve ikisi *S. capitis* olarak tanımlanmıştır. Konjonktivit veya başka bir göz enfeksiyonu tanısı olmayan bu hastalarda üretilen KNS'lar konjonktiva mikrobiyotasına ait bakteriler olarak kabul edilmiştir.

Üreyen KNS türlerinin hidrojel kontakt lens ve silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası konjonktivadaki dağılımları incelendiğinde, hidrojel kontakt lens kullanan 90 hastanın lens kullanım öncesi 51'inde (%56.67), lens kullanım sonrası ise 67'sinde (%74.4) KNS üretilmiştir. Bu stafilokokların lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası türlere göre dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir.

Hidrojel kontakt lens kullanmış olan hastalardan izole edilen toplam KNS türlerinin dağılımı lens kullanım öncesi belirlenen dağılım ile kıyaslandığında her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ). İzole edilen her bir stafilokok türünün gruplar arasında ayrı ayrı dağılımı bakımından da istatistiksel bir fark bulunmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3).

Silikon hidrojel kontakt lens kullanan 50 hastanın lens kullanım öncesi 30'unda (%60), kullanım sonrası ise 42'sinde (%84) KNS üretilmiştir. Bu stafilokokların

**Tablo 3. Kontakt lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası hastaların konjonktiva sürüntülerinden izole edilen KNS türlerinin dağılımı [n (%)].**

Üreyen KNS türleri (n)	Hidrojel kontakt lens kullanan hastalar n=90			Silikon hidrojel kontakt lens kullanan hastalar n=50		
	Kullanım öncesi n (%)	Kullanım sonrası n (%)	P	Kullanım öncesi n (%)	Kullanım sonrası n (%)	P
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (161)	44 (48.8)	52 (57.7)	p>0.05	28 (56)	37 (74)	p>0.05
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (22)	5 (5.6)	10 (11.1)	p>0.05	2 (4)	5 (10)	p>0.05
<i>Staphylococcus caprae</i> (3)	(-)	3 (3.3)	p>0.05	(-)	(-)	p>0.05
<i>Staphylococcus capitis</i> (4)	2 (2.2)	2 (2.2)	p>0.05	(-)	(-)	p>0.05
Toplam (190)	51 (56.7)	67 (74.4)		30 (60)	42 (84)	

**Tablo 4. Kontakt lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası hastaların konjonktiva sürüntülerinde saptanan *icaA* ve *icaD* pozitif *Staphylococcus epidermidis* kökenlerinin dağılımı [n (%)].**

Kontakt lens türü	Lens kullanımı	Üreyen toplam <i>Staphylococcus epidermidis</i> n (%)	<i>icaA</i> (+) <i>icaD</i> (+) <i>Staphylococcus epidermidis</i> n (%)
Hidrojel kontakt lens kullanan hastaların konjonktiva mikrobiyotası (n=90)	Lens kullanım öncesi	44 (48.8)	20 (45.0)
	Lens kullanım sonrası	52 (57.7)	31 (59.0)*
Silikon hidrojel kontakt lens kullanan hastaların konjonktiva mikrobiyotası (n=50)	Lens kullanım öncesi	28 (56.0)	14 (50.0)
	Lens kullanım sonrası	37 (74.0)	26 (70.2)*

\*: p&lt;0.05

lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası türlere göre dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir. Silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası izole edilen toplam KNS türlerinin dağılımı lens kullanım öncesi belirlenen dağılım ile kıyaslandığında her iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (p>0.05). İzole edilen her bir stafilkok türünün gruplar arasında ayrı ayrı dağılımı bakımından da istatistiksel bir fark bulunmadığı saptanmıştır (p>0.05) (Tablo 3).

Hidrojel ve silikon hidrojel kontakt lens kullanım öncesi ve sonrası konjonktiva mikrobiyotasında *icaA* ve *icaD* pozitif *S. epidermidis* kökenlerinin dağılımları Tablo 4'te gösterilmiştir. Hidrojel kontakt lens kullanım sonrası tespit edilen *icaA*(+) ve *icaD*(+) *S. epidermidis* kökeni sayısının, lens kullanım öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Tablo 4). Bunun yanı sıra, silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası tespit edilen *icaA*(+) ve *icaD*(+) *S. epidermidis* kökeni sayısının, lens kullanım öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Tablo 4).

**Tablo 5. Slime üretimi tespitinde Kongo Kırmızılı agar, standart tüp ve multipleks PZR yöntemleriyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması [n (%)].**

Yöntem	Pozitif n(%)
Kongo Kırmızılı Agar	82 (50.9)
Standart Tüp	61 (37.8)
Multipleks PZR	91 (56.5)

Gerek silikon hidrojel kontakt lens kullanan gerekse hidrojel kontakt lens kullanan hastaların lens kullanım öncesi ve sonrası, konjonktiva sürüntülerinden toplam 161 *S. epidermidis* kökeni üretilmiştir. Slime üretiminin saptanmasında kullanılan üç farklı yöntemle elde edilen sonuçlar Tablo 5'de verilmiştir.

## TARTIŞMA

Son yıllarda gerek görme gücünü artırma, gerekse estetik görünüm sağlamak amacıyla kontakt lens kullanımının hızla arttığı görülmektedir. Ancak kontakt lens kullanımının normal konjonktiva mikrobiyotasındaki KNS'lar gibi bakterileri etkilediği ve lens kullanımına bağlı olarak mikrobiyotada değişimler oluşturabileceği, hatta daha da ileri giderek başta konjonktivit ve bakteriyel keratit olmak üzere enfek-

siyonlar gelişebileceği gösterilmiştir<sup>(1,16,17)</sup>.

Konjonktival mikrobiyota doğumdan itibaren gelişen ve yaşam boyu devam eden bir mikroorganizma birlikteliğinden oluşmaktadır. Konjonktiva bazı bireylerde yaşamın belirli bir döneminde özellikle genç yaşta steril kalabilse de, çevreye, yaşa, mevsime, vücut direncine, kontakt lens kullanımına ve diğer faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilen bir mikrobiyota ile kaplanır. KNS'lar konjonktival mikrobiyotadan en çok izole edilen bakteriler olmakla beraber, *S. epidermidis*'in en yoğun kolonize olan bakteri olduğu bilinmektedir<sup>(3)</sup>.

Ulusal çalışmalar incelendiğinde; Erdoğan ve ark.<sup>(18)</sup> sık değişimli yumuşak kontakt lenslerin günlük kullanımından sonra hastaların konjonktiva mikrobiyotasından %30 oranında *S. epidermidis* üretmişlerdir. İskeleli ve ark.<sup>(19)</sup> yumuşak hidrojel kontakt lens kullanımından sonra %49.3 oranında KNS üretmişlerdir. Uluslararası çalışmalar incelendiğinde ise Rahim ve ark.<sup>(20)</sup> yumuşak kontakt lens kullanan 100 hastanın %65'inde lenslerin kontamine olduğunu göstermişlerdir. Lens kullanım sonrası konjonktival mikrobiyotadan %40.6 oranında *S. epidermidis* üretmişlerdir. Willcox ve ark.<sup>(21)</sup> yumuşak lenslerde aerop bakterilerden KNS'ların %39.9 ile en sık rastlanan kontaminant olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda hidrojel kontakt lens kullanan hastalarda lens kullanım sonrası izole edilen mikroorganizmalar başta 52 (%57.7) *S. epidermidis* olmak üzere, 10 (%11.1) *S. lugdunensis*, üç (%3.3) *S. caprae* ve iki (%2.2) *S. capitis* ve silikon hidrojel kontakt lens kullanan hastalarda 37 (%74.0) *S. epidermidis*, beş (%1.0) *S. lugdunensis*'tir.

Son yıllarda giderek artan bir şekilde KNS'lar enfeksiyon gelişiminde önemli bir klinik etken olarak bildirilmektedir. Yapılan hayvan modellenli çalışmalar biyofilm üreten *S. epidermidis* kökenlerinin biyofilm üretmeyen kökenlere göre daha virülan olduğunu göstermiştir<sup>(22,23)</sup>. *S. epidermidis* kökenlerinde hücre içi adezyon moleküllerini kodlayan genlerin varlığının slime üretimi ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>(24)</sup>. Slime üretimi, mikroorganizmaların konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonundan

sorumludur<sup>(14,25)</sup>. Slime üreten kökenler sağlıklı korneayı bile enfekte edebilmektedir<sup>(26)</sup>. Normal konjonktival mikrobiyotada sıklıkla bulunan gram pozitif bakterilerden *S. epidermidis*'in slime üretimi en önemli virülans faktörüdür<sup>(14,25)</sup>. Uluslararası çalışmalar incelendiğinde; Suzuki ve ark.'nın<sup>(27)</sup> sağlıklı insanların konjonktival mikrobiyotalarında *S. epidermidis*'lerin slime üretimini Kongo kırmızılı agar ve PZR yöntemiyle inceledikleri çalışmalarında %60'ının *icaA* geni taşıdığını belirlemişlerdir. Yaptıkları araştırmanın sonucu olarak, slime üreten *S. epidermidis*'lerin oküler enfeksiyonlarda önemi olabileceğini belirtmişlerdir. Catalanotti ve ark.<sup>(28)</sup> ise bakteriyel bilateral konjonktiviti olan ve yumuşak kontakt lens kullanan 97 hastanın konjonktival sürüntü örneklerinde yaptıkları bir çalışmada, izole edilen *S. epidermidis* kökenlerinin %74.1'nin *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olduklarını bildirirken, Murugan ve ark.<sup>(29)</sup> konjonktiviti hastalardan ürettikleri *S. epidermidis*'lerde *icaA* taşıma oranını %66.7 bulmuşlardır. Konjonktiva mikrobiyotasında slime üreten *S. epidermidis* kökenlerinin bulunması, kontakt lens kullanacak olan hastalar için önemli bir veridir. Çalışmamızda hidrojel kontakt lens kullanım öncesi slime pozitif *S. epidermidis* oranı %45.0 iken lens kullanım sonrası %59.0'a, silikon hidrojel kontakt lens kullanım öncesi slime pozitif *S. epidermidis* oranı %50.0 iken lens kullanım sonrası %70.2'ye yükselmiştir. Lens kullanım öncesi oranlarımız Suzuki ve ark.'nın<sup>(27)</sup> sağlıklı insanların konjonktival mikrobiyotasında %60'luk *icaA*(+) ve *icaD*(+) oranlarından az olmakla birlikte, lens kullanım öncesi ve sonrasını inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın önemli bir kısıtlılığı lens kullanım sonrası izole ettiğimiz KNS türlerinin lens kullanım öncesi üretilen türlerle benzerliğinin moleküler yöntemlerle araştırılmamış olmasıdır. Lens kullanım öncesi ve sonrası moleküler olarak benzerlik gösterilen türlerin miktarlarındaki değişiklikler gösterilebilseydi çok daha kapsamlı veriler elde edilmiş olurdu.

Slime üretimini araştırmak amacıyla genellikle kongo kırmızılı agar, standart tüp, mikroplyet ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Araştırmamızda 161 *S. epidermidis* kökeninde slime üretimi kongo kırmızı-

lı agar yöntemi ile %50.9, standart tüp yöntemi ile %37.8, PZR yöntemi ile de %56.5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız kongo kırmızılı besiyeri ile moleküler yöntemler arasında uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. *icaA* ve *icaD* geni taşıyan bütün kökenler kongo kırmızılı agarda siyah koloni oluşturmuşlardır. Ancak moleküler yöntemler ile diğer yöntemlerin arasında tespit ettiğimiz fark, bu genlere sahip her bakteride fenotipik olarak slime özelliğinin görülemeyebileceğini göstermektedir. Standart tüp yöntemindeki oranın diğer yöntemlere oranla daha düşük bulunmasını, değerlendirmenin gözle yapılışından dolayı zayıf pozitif kökenlerin negatif olarak değerlendirilmesi nedeniyle olabileceği kanaatindeyiz. Sonuçlar arasındaki uyum ulusal ve uluslararası verilerle desteklenmektedir<sup>(14,28,29)</sup>.

Çalışmamız sonucunda; slime üreten *S. epidermidis* kökenlerinin saptanmasında, Multipleks PZR ve KKA yönteminin, ST yöntemine göre daha güvenilir olduğu anlaşılmıştır. Mikrobiyal keratit gelişmesinde hazırlayıcı faktörlerden biri olduğu kabul edilen kontakt lens kullanımının, konjonktiva mikrobiyotasında bulunan KNS türlerinin dağılımında anlamlı bir değişime neden olmadığı ancak gerek hidrojel kontakt lens gerekse silikon hidrojel kontakt lens kullanımının konjonktiva mikrobiyotasında bulunan *icaA* ve *icaD* pozitif *S. epidermidis* kökenlerinin miktarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi), Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (2010-20669) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Finansal Destek:** İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 7346).

**Ethics Committee Approval:** It was approved by the Istanbul University-Cerrahpaşa Faculty of Medicine (Istanbul University, Cerrahpaşa Faculty of Medicine),

Clinical Research Ethics Committee (2010-20669).

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

**Funding:** Research Fund of Istanbul University-Cerrahpaşa (Research Fund of Istanbul University). Project No: 7346.

## KAYNAKLAR

1. Birinci H, Birinci A, Şahin M, Öge F, Öge İ. Konjonktival floranın insülin kullanan diabetik hastalar ile kontrollerde karşılaştırılması. Turk Oftalmol Derg. 1998;28: 144-6.
2. Stroman DW, Bartell JG, Schleich BA. Evidence for *Propionibacterium acnes* as a conjunctival pathogen. 41st Annual Meeting 2007 Ocular Microbiology and Immunology Group (OMIG), 9 November 2007, New Orleans, Louisiana; 2007:A8.
3. Yıldırım N, Akgün Y, Topbaş S, Başmak H, Kiraz N, Yurdakul S. Çeşitli göz enfeksiyonlarında konjonktiva kültürlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 1990;24:71-8.
4. Osato MS. Normal ocular flora. In: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR (Eds.) Ocular infection and immunity. St.Louis: Mosby, 1996:191-9.
5. Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. Clin Oral Implants Res. 1999;10(5):339-45. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1999.100501.x>
6. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881-90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
7. Sankaridurg PR, Markoulli M, Jara PL, et al. Lid and conjunctival micro biota during contact lens wear in children. Optom Vis Sci. 2009;86(4):312-7. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e318199d20c>
8. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol. 1994;48:585-617. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003101>
9. Pastewski BM, Lee AM. Contact Lens Care (Part 1). Am Drug. 1985;192(11):117-39.
10. Engle JP. Contact Lens Care. Am Drug. 1990;201(1):54-65.
11. TC. Sağlık Bakanlığı. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2018. Ankara, 2019. [<https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/36134,siy2018trpdf.pdf?0>] (Erişim tarihi: Mayıs.2021)
12. Göğüş MU. Mikrobiyal keratitli hastalarda epidemiyolojik, laboratuvar ve klinik sonuçlar [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2013.
13. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for



- detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989 Aug;42(8):872-4.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
14. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1982;37(1):318-26.  
<https://doi.org/10.1128/iai.37.1.318-326.1982>
  15. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2151-6.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001>
  16. Birinci H, Birinci A, Acar O, Öge İ, Günaydin M. Hemodiyaliz hastalarında konjonktival flora. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol.* 1998;7(4):262-5.
  17. Iskeleli G, Bahar H, Unal M, Artunay O, Akova N, Torun MM. Microbiologic evaluation of frequent-replacement soft contact lenses. *CLAO J.* 2002;28(4):192-5.  
<https://doi.org/10.1097/01.ICL.0000024118.45191.9B>
  18. Erdoğan H, Kemal M, Toker MI, Topalkara A, Bakici Z. Effect of frequent-replacement contact lenses on normal conjunctival flora. *CLAO J.* 2002;28(2):94-5.
  19. Iskeleli G, Bahar H, Eroglu E, Torun MM, Ozkan S. Microbial changes in conjunctival flora with 30-day continuous-wear silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2005;31(3):124-6.  
<https://doi.org/10.1097/01.ICL.0000141923.63458.DF>
  20. Rahim N, Bano H, Naqvi BS. Bacterial contamination among soft contact lens wearer. *Pakistan J Ophthalmol.* 2008;24(2):93-6.
  21. Willcox MD, Power KN, Stapleton F, Leitch C, Harmis N, Sweeney DF. Potential sources of bacteria that are isolated from contact lenses during wear. *Optom Vis Sci.* 1997;74(12):1030-8.  
<https://doi.org/10.1097/00006324-199712000-00025>
  22. Deighton MA, Borland R, Capstick JA. Virulence of *Staphylococcus epidermidis* in a mouse model: significance of extracellular slime. *Epidemiol Infect.* 1996;117(2):267-80.  
<https://doi.org/10.1017/S0950268800001448>
  23. Gelosia A, Baldassarri L, Deighton M, van Nguyen T. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(4):193-9.  
<https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00214.x>
  24. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Aricola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3235-8.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3235-3238.1999>
  25. Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral - blood cultures. *Lancet.* 1999;354(9184):1071-7.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11134-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11134-0)
  26. Garcia-Saenz MC, Arias-Puente A, Fresnadillo-Martinez MJ, Paredes-Garcia B. Adherence of two strains of *Staphylococcus epidermidis* to contact lenses. *Cornea.* 2002;21(5):511-5.  
<https://doi.org/10.1097/00003226-200207000-00014>
  27. Suzuki T, Kawamura Y, Uno T, Ohashi Y, Ezaki T. Prevalence of *Staphylococcus epidermidis* strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. *Am J Ophthalmol.* 2005;140(5):844-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.05.050>
  28. Catalanotti P, Lanza M, Del Prete A, et al. Slime-producing *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact lens wearers. *New Microbiol.* 2005;28(4):345-54.
  29. Murugan K, Usha M, Malathi P, Saleh Al-Sohaibani A, Chandrasekaran M. Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus* spp. among patients with conjunctivitis. *Pol J Microbiol.* 2010;59(4):233-9.  
<https://doi.org/10.33073/pjm-2010-036>

# Salgınlarla İlişkili STEC Suşlarının Filogeni ve Virülans Genlerinin *in silico* Analizi

## *In silico* Analysis of Phylogeny and Virulence Genes in STEC Strains Associated with Outbreaks

Mehmet Demirci\*<sup>1</sup>, Akın Yiğın\*\*<sup>2</sup>, Fadile Yıldız Zeyrek\*\*\*<sup>3</sup>

\* Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırklareli, Türkiye

\*\* Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

\*\*\* Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

**Atf/Cite as:** Demirci M, Yiğın A, Zeyrek FY. Salgınlarla ilişkili STEC suşlarının filogeni ve virülans genlerinin *in silico* analizi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):415-20.

### Öz

**Amaç:** Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) suşlarını önemli bir gıda kaynaklı patojendir. Coğrafya, zaman veya kaynak farklı olsa bile STEC suşları ile önemli salgınlarla karşılaşabilmektedir. Biz de bu nedenle çalışmamızda, dünyanın farklı bölgelerinde önemli salgınlarda etken olarak saptanan ve genomik verileri açık veri tabanlarında bulunan EDL933 ve Sakai gibi STEC kökenlerini karşılaştırarak hangi virülans faktörlerini kullandıklarını ve bu kökenlerin birbirleri ile olan benzerliklerini *in silico* olarak karşılaştırmayı amaçladık.

**Yöntem:** Çalışmamıza farklı zamanlarda, dünyanın farklı bölgelerinde önemli salgınlar yapan yedi farklı SYEC suşu ve inek dışısından elde edilen bir süper bulaştırıcı kökene ait olmak üzere toplam sekiz suşun genomik verileri dâhil edildi. Kökenlere ait veriler NCBI veri tabanından indirildi. Filogeni analizi ve virülans gen analizleri sırasıyla CSI filogeni ve VFanalyzer online programlarıyla yapıldı.

**Bulgular:** Filogeni analizine göre EDL933 suşuna en benzer suş, %96.4 benzerlikle TW14588 suşuydu. En az benzeyen köken ise %79.15 benzerlikle Sakai kökeni olarak saptandı. Virülans genleri analizine göre ise dokuz başlık altında virülans faktörlerini meydana getiren 333 gene varlığı belirlendi. İlk STEC suşu EDL933'de, tüm virülans genlerinden %45'inin aktif olduğu saptandı. Stx genleri dışında tüm kökenlerde Ecp, Elf, Hcp gibi aderans genleri ve clyA gibi toksin genleri aktifti olduğu görüldü.

**Sonuç:** Çalışmamızda, salgınlarla ilişkili STEC kökenlerinin karşılaştırmalı genomik analizlerinde, stx geni dışında farklı virülans genlerini de kullandığı *in silico* olarak saptandı. Özellikle belli virülans genleri; kaynağı, zamanı ve lokasyonu farklı olsa da kullanması gereken genler olarak ön plana çıkmakta ve patogeneze bu genleri kullanmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** STEC, O157: H7, *in silico* analiz, virülans genleri

### ABSTRACT

**Objective:** Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains are important foodborne pathogens. Significant outbreaks with STEC strains can be encountered, even if the geography, time or resources were different. The aim of our *in silico* study was to compare the virulence factors and phylogeny of STEC strains such as EDL933 and Sakai, which have been identified as an agent in important outbreaks in different parts of the world and whole genomic data were in open databases.

**Method:** Genomic NCBI data of eight strains were included in our study, including seven different STEC strains associated with significant epidemics in different parts of the world, and one super-shedder strain obtained from cattle feces.

**Results:** According to phylogeny analysis, the most similar strain to EDL933 strain was TW14588, with 96.4% similarity. The most distant similarity was Sakai strains with 79.2%. According to the virulence genes analysis; the presence of 333 genes that constitute virulence factors under nine headings were detected. In the first STEC origin, EDL933, 45% of all virulence genes were found to be active. Adherence genes such as Ecp, Elf, Hcp and toxin genes such as clyA were active in all strains except stx genes.

**Conclusion:** In our *in silico* study of comparative genomic analysis of STEC strains which are associated with outbreaks, it was determined that STEC strains used different virulence genes besides the stx gene. Indeed, they used certain virulence genes, even their sources, time and locations were different, in the pathogenesis.

**Keywords:** STEC, O157: H7, *in silico* analysis, virulence gene

**Alındığı tarih / Received:**

09.05.2021 / 09.May.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**

06.08.2021 / 06.August.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**

23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

M. Demirci 0000-0001-9670-2426

A. Yiğın 0000-0001-9758-1697

F. Yıldız Zeyrek 0000-0001-7386-9944

✉ akinyigin@yahoo.com

## GİRİŞ

*Escherichia coli*, insanlar ve hayvanların normal flora-sında bulunan hem kommensal bir bakteri hem de intra ve extra intestinal ciddi enfeksiyonlara da neden olabilen önemli patojen bir bakteridir<sup>(1)</sup>. Gastroenteritlere neden olabilen diyarejenik *E. coli* (DEC), enterotoksijenik *E. coli* (EPEC), enteropatoge-nik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), ente-rohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz aderan *E. coli* (DAEC) olmak üzere 6 farklı patotipi vardır<sup>(2)</sup>. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) O157:H7, şiddetli-kanlı ishalleri neden olan gıda kaynaklı patojenler arasında çok önemli türdür. Bu kanlı ishaller, Shiga toksin kaynaklı olduğu için EHEC ayrıca Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) olarak da adlandırılmaktadır<sup>(3,4)</sup>. STEC, kromozomal genler tara-fından kodlanan çok farklı virülans faktörlerine sahip-tir ve bunlar genellikle patojenite adalarında (PAI'ler) veya plazmidlerinde bulunur. *stx* geni aracılı shiga toksininin üretimi, STEC suşlarının endotel hücre hasarına yol açan en önemli faktörlerden birisidir. *stx* genlerinin farklı alt tipleri bulunmaktadır ve bu fark-lılık hastalığın şiddeti açısından önemli bir belirteç olmakla birlikte, *stx*'in tüm patojeniteden tek başına sorumlu olduğu anlamına gelmediği, birçok virülans faktörünün işin içine dâhil olduğu da bildirilmektedir<sup>(4)</sup>. STEC suşları insanlar ve çok farklı sıcakkanlı hayvan-larda saptanabilmektedirler ama özellikle geviş geti-ren hayvanlar, insanlarda görülen enfeksiyonlar için ana rezervuardırlar ve bu nedenle STEC kaynaklı besin zehirlenmelerinin ana kaynağı sayılmaktadırlar<sup>(5)</sup>. İlk defa 1983 yılında Amerika'nın Michigan şehrinde meydana gelen salgında dana kıymalarından elde edilmiş olan *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 EDL933 suşu ile bu suşlar tanınmıştır<sup>(6)</sup>. Daha sonra 1996 yılında Japonya'nın Sakai şehrinde beyaz turp filizi tüketimi sonucunda olduğu saptanan ve özellikle okul çağındaki çocukları etkileyen *E. coli* O157:H7 Sakai suşu salgınıyla kendi-ni göstermiştir<sup>(7)</sup>. Son yıllarda tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni ve detaylı moleküler tekniklerin gelişmesi, STEC suşlarının epidemiyolojik özellikleri-nin belirlenmesine katkı sağlamıştır<sup>(8)</sup>. Ayrıca bu yön-temler, farklı virülans faktörlerinin belirlenmesini sağlayarak, özellikle halk sağlığına katkı

sağlamaktadır<sup>(9)</sup>. Biz de bu nedenle çalışmamızda, dünyanın farklı bölgelerinde önemli salgınlar yapan ve tüm genom dizileme teknikleri ile dizilenecek genomik verileri açık veri tabanlarında bulunan EDL933 ve Sakai gibi *E. coli* O157:H7 suşları karşılaştı-rarak hangi virülans faktörlerini kullandıklarını ve bu suşların birbirleri ile olan benzerliklerini *in silico* olarak karşılaştırmayı amaçladık.

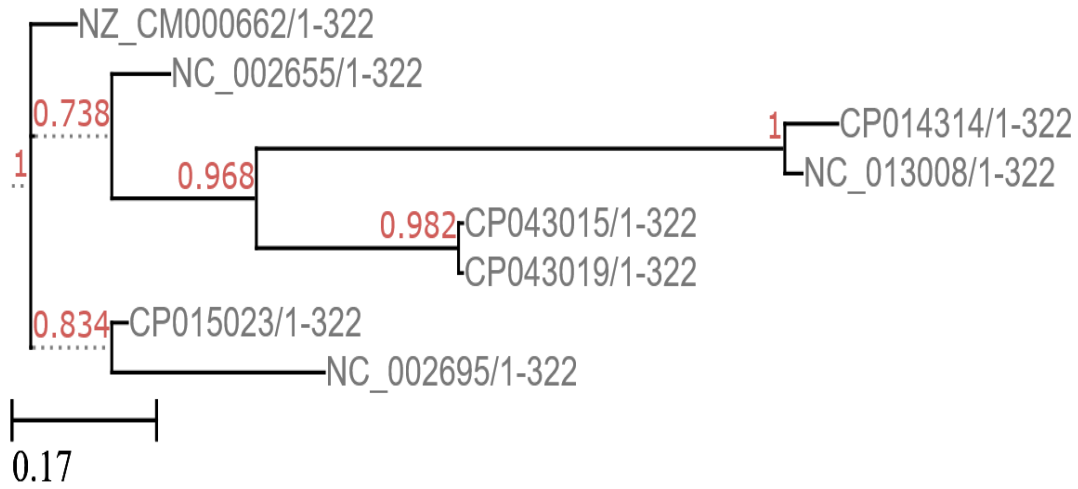
## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza, farklı zamanlarda dünyanın farklı böl-gelerinde önemli salgınlar yapan yedi farklı *E. coli* O157:H7 suşu genomik verileri dâhil edildi. Bu suşların tüm genom analizlerine ait genomik verileri NCBI veri tabanından indirilerek çalışmamızda kullanıldı. Bu suşların virülans özelliklerini karşılaştırmak amacıyla inek dışkısında saptanan ve süper yayıcı karakter-de olduğu bildirilen bir suş çalışmamıza dâhil edil-di. Ayrıca çalışmamıza dâhil edilen *E. coli* O157 suşlarının seçilmesinde bu suşun tanımlanmasına neden olan, salgınları ile sıklıkla makalelere konu edilmiş, birçok yayında referans suş olarak kullanılan ve WGS analizleri tüm olarak tamamlanarak ayrıntılı olarak incelenmiş suşlar çalışmamızda seçerek ince-lemeye alınmıştır.

Bu suşlara ait NCBI erişim numaraları ve suş bilgileri Tablo 1'de verilmiştir. Bu suşların plazmidleri çalışma-mıza dâhil edilmemiştir. Suşların birbirleri ile evrimsel olarak yakınlıkları CSI filogeni yazılımı ile (<https://www.genomicepidemiology.org/>) gerçekleştirildi. CSI filogeni yazılımı, büyük fasta dosyaları üstünde tek nokta polimorfizmlerini (SNP) otomatik olarak kontrol ederek tüm karşılaştırılan dizilerde bunları incelemek-tedir ve yazılım genomlardaki SNP'leri filtreleyerek, bölgelerin doğrulamasını yapmaktadır. Sistem tarafın-dan oluşturulan bu yüksek kaliteli SNP'lerin birleştiril-miş hizalamalarına dayalı otomatik bir filogeni analizi çıkartmaktadır<sup>(10)</sup>. Suşlarda bulunan virülans genleri-nin karşılaştırmalı analizi VF analiz programı (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) ile gerçekleştirildi. VF analiz programı da virülans genlerinin belirlenmesi için basit blastlama algoritması yerine karşılaştırılan referans genomlara göre taşınan açık okuma bölgelerinin oto-matik olarak karşılaştırmalarını sağlamaktadır<sup>(11)</sup>.

Tablo 1. Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait bilgiler ve benzerlik oranları.

NCBI gen bankası erişim numarası	Salgın nedeni	Suş Adı	Saptama Tarihi	Benzerlik oranı
NC_002655	Kontamine hamburgerleri içeren bir salgınla bağlantılı olarak Michigan dana kıymalarından izole edilmiş izolat	EDL933	1983, Amerika	100
NC_002695	Beyaz turp filizlerinin tüketimi ile ilişkili salgında, ilkökul çocuklarında izole edilmiş klinik izolat	Sakai	1996, Japonya	79.15
CP015023	Elma şarabı gibi asitlenmiş gıdalarla ilişkili salgında izole edilen izolat	SRCC 1675	2002, Amerika	95.84
NC_013008	İspanakla ilişkili salgında bir hastadan elde edilen klinik izolat	TW14359	2006, Amerika	93.30
NZ_CM000662	Iceberg Marul ile bağlantılı Taco John's restoranlarında gelişen salgında izole edilen klinik izolat	TW14588	2006, Amerika	96.40
CP043015	İşkembe gibi çiğ ürünlere temas sonrası gelişen salgında izole edilen klinik izolat	<i>Escherichia coli</i> 388808	2017, İngiltere	93.84
CP043019	İşkembe gibi çiğ ürünlere temas sonrası gelişen salgında izole edilen klinik izolat	<i>Escherichia coli</i> 397404	2017, İngiltere	96.15
CP014314	Süper bulaştırıcı suş (inek dışısından izole edilmiş)	JEONG-1266	2016, Amerika	93.40



Şekil 1. Suşların tek nokta polimorfizm (SNP) temelli benzerliğine göre filogeni ağacı.

## BULGULAR

Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait genomik veriler analiz edildiğinde, dana kıymalarından 1982'deki salgında elde edilen EDL933 suşuna en benzer suşun, 2006'da yine Amerika'da marul kaynaklı salgında hastalardan izole edilen TW14588 suşunun olduğu belirlendi. Benzerlik oranı %96.4'tü. İngiltere'de 2017 yılında saptanan suşlardan birisi %96.15 oranında benzerlik gösterirken, aynı salgında izole edilen diğer suş %93.84 benzerdi. En düşük benzerliğin 1996'da

Japonya'nın Sakai kentindeki salgında çocuklarda belirlenen Sakai suşu olduğu ve benzerliğin %79.15 olduğu görüldü. Tüm suşlara ait benzerlik oranları Tablo 1'de verilmiştir. 2016'da Amerika'da süper bulaştırıcı karakterde olduğu saptanan ve inek dışıklarından elde edilen JEONG-1266 suşunun EDL933 suşuna benzerliğinin %93.4 olduğu bulundu (Şekil 1).

Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait virülans genlerinin dağılımı incelendiğinde, virülans genlerinin ade-rans, (19 öge - 89 gen), ototransporter (19 öge - 20

Tablo 2. Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait virülans genlerinin dağılımı.

	İlgili genler	NC_002655 EDL933	NC_002695 Sakai	NC_013008 TW14359	NZ_CM000662 TW14588	CP043015 388808	CP043019 397404	CP015023 SRCC 1675	CP014314 JEONG-1266
Aderans, (19 öge-89 gen)	89	26	24	24	24	25	25	25	26
Ototransporter (19 öge-20 gen)	20	5	5	4	4	5	5	4	3
invasyon (2 öge-4 gen)	4	2	2	2	2	2	2	2	2
Demir kullanımı (6 öge-33 gen)	33	7	7	7	8	8	8	8	8
LEE-encoded TTSS efektörleri (7 öge-7 gen)	7	7	7	7	5	5	5	5	5
Non-LEE encoded TTSS efektörler (55 öge-55 gen)	55	47	46	45	39	37	37	37	38
Düzenleyici (1 öge-1 gen)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sekresyon sistemi (5 öge-104 gen)	104	51	51	51	42	42	43	43	46
Toksin (10 öge-20 gen)	20	5	5	3	5	3	3	5	3
stx1A		+	+	+	+	+	+	+	+
stx1B		+	+	+	+	+	+	+	+
stx2A		+	+	+	+	+	+	+	+
stx2B		+	+	+	+	+	+	+	+
Taşınan virülans gen (Orf Sayısı)	333	150	147	143	129	127	128	129	131
Taşınan virülans gen (Orf Sayısı) (%)		45	44	43	39	38	38	39	39

gen), invazyon (2 öge - 4 gen), demir kullanımı (6 öge - 33 gen), LEE-encoded TTSS efektörleri (7 öge - 7 gen), non-LEE encoded TTSS efektörler (55 öge - 55 gen), düzenleyici (1 öge - 1 gen), sekresyon sistemi (5 öge - 104 gen) ve toksin (10 öge - 20 gen) olmak üzere dokuz başlık altında olduğu saptandı. Bu 9 başlık altındaki virülans faktörlerini meydana getiren 333 virülans genini üretebilen açık okuma çerçevesi (orf) varlığı belirlendi. Toksin virülans faktörlerinden birisi olan *Stx* geni özellikleri incelendiğinde, 4 suşun *stx1a*, *1b*, *2a* ve *2b* üretimini yapabildikleri diğer 4 suşun ise yalnızca *stx2a* ve *2b* üretebilecek orf içerdikleri saptandı. Diğer virülans faktörleri incelendiğinde, virülans genini üretebilen açık okuma çerçevesi (orf) içermeleri açısından en düşük seviyede 2017'de İngiltere'de salgın oluşturan suşların olduğu belirlendi. Tüm orf bölgelerinin ortalama %38'inin bu suşlarda bulunduğu görüldü. EDL933 suşunda ise tüm virülans genleri oluşturan orf bölgelerinin %45'inin bulunduğu saptandı. Tüm suşlarda Aderans ile ilgili olarak *EaeH* geni, genel pili geni (*Ecp*), laminin bağlayıcı fimbria geni (*Elf*) ve hemorragic *E. coli* pilus (*Hcp*) genleri taşıyordu. Bakteriyel membranlarından direkt geçişle ilgili olan ototransporter genlerinden *EhaA*, *AIDA-I* type geni tüm suşlarda taşınmaktaydı. Toksin virülans faktörlerine *stx* dışında bakıldığında, *hemolysin/cytolysin A (hlyE/clyA)* geninin tüm suşlarda taşındığı saptandı.

## TARTIŞMA

*Escherichia coli* O157:H7 veya Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) suşları, önemli bir gıda kaynaklı patojendir ve 1983'te tanımlandığından beri önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır<sup>(12)</sup>. *E. coli* O157:H7 ile ilişkili halk sağlığı risklerini değerlendirmek için, suşlar arasındaki fenotipik ve genotipik farklılıkları anlamak çok önemlidir<sup>(13)</sup>. Son yıllarda tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni ve detaylı moleküler tekniklerin gelişmesi, STEC suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin belirlenebilmesine ciddi katkı sağlamıştır<sup>(8)</sup>.

Wu ve ark.<sup>(12)</sup> 2008 yılında *E. coli* O157:H7 suşları üstünde mikroarray yöntemi ile yaptıkları çalışmada, %80 ve üzerindeki benzerlikleri baz almışlardır ve bu

suşları benzer kabul etmişlerdir. Çalışmamızda, Sakai suşu dışında benzerliklerin %80 ve üstünde olduğunu gördük. Sakai EDL 933'e benzerliğin bir miktar daha düşük saptanması benzerlik analizine plazmidlerin dâhil edilmemiş olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Elhadidy ve ark.<sup>(13)</sup>, insan ve gıda kaynaklı suşlarda SNP benzerliklerini karşılaştırdıklarında, insanlarda saptanan suşların gıda kaynaklı suşlara %92 oranında benzer olduğunu belirlemişlerdir. Her ne kadar karşılaştırılan suşlar çalışmamıza tümüyle benzer olmamasına karşın, çalışmamızda da incelediğimiz suşlardaki benzerlik oranlarının klinik izolatlarda %90 ve üzerinde olduğu ve literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

*Escherichia coli* O157:H7 suşlarının virülans genleri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, çalışmaların öncelikle *stx* genlerine odaklandığı ve bu suşlardaki *stx* geni ve alt gruplarının tayin edilmeye çalışıldığı görülmektedir<sup>(14,15)</sup>. Teng ve ark.<sup>(16)</sup> 2016 yılında inek dışkıсында saptadıkları süper bulaştırıcı O157:H7 suşunun belirlenen ilk suş olan EDL933 suşuna virülans genleri açısından %80 ve üzeri benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Biz de çalışmamızda, incelediğimiz çalışmaların %80 ve üzerinde benzer virülans genlerini taşıdıklarını saptadık.

Rossez ve ark.<sup>(17)</sup> 2014 yılında yaptıkları çalışmada, *E. coli* genel pili (*Ecp*) suşlarının genlerinin oligosakkaritlere bağlanması için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ispanak gibi sebzelerde özellikle *Ecp* geni proteinlerinin bağlanabileceği hedeflerinin daha fazla eksprese olduğunu belirlemişlerdir<sup>(17)</sup>. Biz de çalışmamızdaki tüm suşlarda bu pilusa ait genlerin taşındığını gördük. Samadder ve ark.<sup>(18)</sup> 2009 yılında, *E. coli* laminin-bağlayıcı fimbriae (*Elf*) genlerinin insan epitel hücrelerine, inek ve domuz dokularına STEC suşlarının bağlanabilmesi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da incelediğimiz tüm O157:H7 suşlarında *Elf* genlerinin taşındığını gördük. Ledesma ve ark.<sup>(19)</sup> 2010 yılında yaptıkları çalışmada, *hemorajik E. coli pilus (HCP)* genlerinin özellikle *HcpA*'nın; IL-8 ve TNF-alfa gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğunu göstermişlerdir. *E. coli* O157:H7 suşlarının, kanlı ishal semptomlarına neden olabilmesi için bu gen ve

proteinlerinin olması gerektiğini bildirmişlerdir<sup>(19)</sup>. Tüm suşlarımızda bu genlerin orf bölgelerine sahip olması bu suşların bu geni taşıdıkları için kullanabilecek yetenekleri olduğunu bize düşündürmüştür. Wells ve ark.<sup>(20)</sup> 2008 yılında yaptıkları çalışmada, *E. coli* O157:H7 suşlarının bakteriyel membranlarından direkt geçişle ilgili olan ototransporter genlerinden *EhaA*, *AIDA-I type* geninin bu suşlarda ayrıca adezyon, kolonizasyon ve biyofilm oluşumuna katkıda sağladığını bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda, tüm suşların da bu genin taşındığını ve ilgili orfların olduğunu gözlemledik.

Roderer ve ark.<sup>(21)</sup> yaptıkları çalışmada, *Hemolysin/cytolysin A (hlyE/clyA)* geninin önemli bir por oluşturan toksin olduğunu bildirmişlerdir. Hunt ve ark.<sup>(22)</sup> da bu toksinin özellikle eritrosit ve memeli hücrelerinde por açmak için kullandıklarını açıklamışlardır. Bizim suşlarımızın da bu toksini diğer *stx* genleri yanında taşıyor olması bu bilgilerle benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda STEC (*Escherichia coli* O157:H7) suşlarının karşılaştırmalı genomik analizinde, *stx* geni dışında farklı virülans genlerini de taşıdıkları saptandı. Özellikle belli virülans genleri; kaynağı, zamanı ve lokasyonu farklı olsa da taşıdıkları genler olarak ön plana çıkmakta ve patogenezde bu genleri kullanabilecek şekilde genomlarında taşımaktadırlar. Tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni moleküler teknikler özellikle tüm dünyada bu suşların surveyansı için kullanılabilir yöntemlerdir ve epidemiyolojisinin daha net anlaşılmasını sağlayacaktır.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

#### KAYNAKLAR

1. Clermont O, Olier M, Hoede C, et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol.*

- 2011;11(3):654-62.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.005>.
2. Miri ST, Dashti A, Mostaan S, et al. Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran. *Iran J Microbiol*. 2017;9(1):33-7.
  3. Luzader DH, Willsey GG, Wargo MJ, et al. The type three secretion system 2-encoded regulator *EtrB* modulates enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene expression. *Infect Immun*. 2016;84(9):2555-65.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00407-16>
  4. Rubab M, Oh DH. Virulence characteristics and antibiotic resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(9):587.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9090587>
  5. Jajarmi M, Askari Badouei M, Imani Fooladi AA, et al. Pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of caprine origin: virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):97.  
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1407-2>
  6. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, et al. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol*. 1983;18(3):512-20.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.18.3.512-520.1983>
  7. Michino H, Araki K, Minami S, et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol*. 1999;150(8):787-96.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010082>
  8. Holmes A, Allison L, Ward M, et al. Utility of whole-genome sequencing of *Escherichia coli* O157 for outbreak detection and epidemiological surveillance. *J Clin Microbiol*. 2015;53(11):3565-73.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01066-15>
  9. Lang C, Hiller M, Konrad R, et al. whole-genome-based public health surveillance of less common Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serovars and untypeable strains identifies four novel O genotypes. *J Clin Microbiol*. 2019;57(10): e00768-19.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00768-19>
  10. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, et al. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One*. 2014;9(8): e104984.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>
  11. Liu B, Zheng D, Jin Q, et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1): D687-92.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
  12. Wu G, Carter B, Mafura M, et al. Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates and identification of genes linked to human infections. *Infect Immun*. 2008;76(2):845-56.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00956-07>
  13. Elhadidy M, Elkhatib WF, Elfadl EAA, et al. Genetic diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 recovered from human and food sources. *Microbiology (Reading)*. 2015;161(Pt 1):112-9.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.083063-0>
  14. Greig DR, Jenkins C, Gharbia SE, et al. Analysis of a small outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 using long-read sequencing. *Microb Genom*. 2021;7(3).  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000545>
  15. Munns KD, Zaheer R, Xu Y, et al. Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from super-shedder and low-shedder cattle. *PLoS One*. 2016;11(3): e0151673.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151673>
  16. Teng L, Ginn A, Jeon S, et al. Complete genome sequence of an *Escherichia coli* O157:H7 strain isolated from a super-shedder steer. *Genome Announc*. 2016;4(2): e00258-16.  
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00258-16>
  17. Rossez Y, Holmes A, Lodberg-Pedersen H, et al. *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. *J Biol Chem*. 2014;289(49):34349-65.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587717>
  18. Samadder P, Xicohtencatl-Cortes J, Saldaña Z, et al. The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. *Environ Microbiol*. 2009;11(7):1815-26.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01906.x>
  19. Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, et al. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5(8):e12127.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012127>
  20. Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, et al. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol*. 2008;10(3):589-604.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01479.x>
  21. Roderer D, Glockshuber R. Assembly mechanism of the  $\alpha$ -pore-forming toxin cytolysin A from *Escherichia coli*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1726):20160211.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0211>
  22. Hunt S, Green J, Artymiuik PJ, et al. Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related toxins. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 677:116-26.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6327-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6327-7_10)

# Maya Mantarlarının Hızlı Tanımlanmasında Lizis Filtrasyon Sonrası MALDI TOF-MS Yönteminin Kullanımı

## Use of MALDI TOF-MS Method After Lysis Filtration for Rapid Identification of Yeast

Sami Eren<sup>®</sup>, Dilek Yeşim Metin<sup>®</sup>, Süleyha Hilmioğlu Polat<sup>®</sup>

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

**Atf/Cite as:** Eren S, Metin DY, Hilmioğlu Polat S. Maya mantarlarının hızlı tanımlanmasında lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF-MS yönteminin kullanımı, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):421-7.

### Öz

**Amaç:** İnvazif kandidozda erken tanı çok önemlidir ve mortalite oranını düşürmek için kısa sürede ve güvenilir sonuç veren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, *Candida* türlerinin daha hızlı tanımlanabilmesi için lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yönteminin uygunluğu araştırılmıştır.

**Yöntem:** Bu çalışmada, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden izole edilen 100 *Candida* kökeni, Dalmay plak, MALDI-TOF MS ve lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yöntemleriyle araştırıldı ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmamızda konvansiyonel ve MALDI-TOF MS tanımlama yöntemlerine göre; 37 *Candida albicans*, 23 *Candida parapsilosis*, 17 *Candida tropicalis*, dokuz *Candida glabrata*, altı *Candida kefyar*, üç *Candida guilliermondii*, üç *Candida dubliniensis*, üç *Candida krusei* olarak tanımlanmıştır. Lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yönteminde ise identifikasyon sonuçları; 26 *C. albicans*, dokuz *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, dokuz *C. glabrata*, iki *C. kefyar*, üç *C. dubliniensis*, iki *C. krusei* olarak belirlenmiştir. MALDI-TOF MS yöntemi ve Dalmay plak ile lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yöntemi 64 kökende uyumlu bulunmuştur. Uyumsuzluğun yanlış tanımlamadan değil, spektrum yetersizliğinden kaynaklandığı gözlemlenmiştir.

**Sonuç:** "Spektrum yetersizliği" olarak tanımlanmayan suşlar veri tabanında yer alan türlerden oluşmaktadır. Altmış dört *Candida* türünün standart yöntemlerle %100 uyumlu olacak şekilde tanımlama yaptığı ve bu yöntemin subkültür gerektiren MALDI-TOF MS yöntemine göre en az 48 saat, Dalmay plak yöntemine göre de en az 72 saat avantaj sağladığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** MALDI-TOF, kütle spektrometrisi, filtrasyon, *Candida* spp

### ABSTRACT

**Objective:** The early diagnosis of candidosis is very important in fungal infections and to reduce mortality rates, short-term and reliable methods are needed. In this study, the appropriateness of MALDI-TOF MS method after lysis filtration was investigated for the faster identification of *Candida* spp.

**Method:** 100 *Candida* isolated from positive blood cultures sent to Ege University, School of Medicine, Medical Microbiology laboratory, were studied with Dalmay plaque, MALDI-TOF MS and after lysis filtration methods. The results were compared with those obtained from the classical MALDI-TOF MS method.

**Results:** According to conventional and MALDI-TOF MS identification methods; 37 *Candida albicans*, 23 *Candida parapsilosis*, 17 *Candida tropicalis*, nine *Candida glabrata*, six *Candida kefyar*, three *Candida guilliermondii*, three *Candida dubliniensis* and three *Candida krusei* were identified. After lysis filtration method; 26 *C. albicans*, nine *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, nine *C. glabrata*, two *C. kefyar*, three *C. dubliniensis*, two *C. krusei*. MALDI-TOF MS method and Dalmay plaque and after lysis filtration method were found to be compatible in 64 strains. Incompatibility was not due to incorrect identification, but spectrum deficiency.

**Conclusion:** The strains, which are not identified as "spectrum deficiency" consist of the species in the database. Sixty-four *Candida* species were found to be 100% compatible with the standard methods and this method was found to be advantageous for at least 48 hours compared to MALDI-TOF MS method which required subculture and for at least 72 hours compared to Dalmay plaque method.

**Keywords:** MALDI-TOF, mass spectrometry, filtration, *Candida* spp

**Alındığı tarih / Received:**  
12.02.2021 / 12. February.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
22.04.2021 / 22. April.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23. September.2021

### ORCID Kayıtları

S. Eren 0000-0002-6263-8048  
D.Y. Metin 0000-0002-7282-5031  
S. Hilmioğlu Polat 0000-0001-8850-2715

✉ dilekyesimb@yahoo.com

\* Bu çalışma, Dr. Sami Eren'in tezinden türetilmiştir.



## GİRİŞ

Mantarlar, bağışıklığı normal kişilerde yüzeysel enfeksiyonlar oluştururken, bağışık sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden, morbidite ve mortalitesi yüksek ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır<sup>(1)</sup>. Fungemi, özellikle de kandidemi bağışık baskılı hastalarda en sık görülen mantar enfeksiyonudur.

Kandidemilerin tanısında altın standart yöntem kan kültürüdür. Kültür sonucunda üreyen etkenin tür düzeyinde tanımlanması, olası direncin öngörülmesi ve uygun tedavinin planlanmasına olanak vermektedir. Ancak kan kültüründe mantarların üremesi zaman alıcı olup en erken 2-4 gün arasında değişmekte, üreyen etkenin tür düzeyinde tanımlanması da mevcut yöntemlerle 48-72 saatte gerçekleştirilmektedir. Yapılan araştırmalarda kandidemili hastalarda tanıdaki gecikmelerin mortalite ile ilişkili olduğu, antifungal tedaviye başlamadaki gecikmelerin mortalite oranını artırdığı bildirilmiştir<sup>(2)</sup>.

Bu çalışmada, kan kültüründe üreyen *Candida*'ların erken dönemde lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS (LF-MS) ile tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik Kurulu tarafından (26.08.2021 tarih ve 21-8T/33 No.) onaylanmıştır. Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında kan kültüründe üreme sinyali veren kan kültür şişelerinden yapılan Gram boyalı preparatlarda maya hücresi görülen, randomize 100 örnek çalışmaya alındı. Bu şişelerden tür tanımlaması için, rutin uygulamada yapılan Dalmau plak ve MALDI-TOF MS yöntemine paralel olarak LF-MS yöntemi uygulandı. Rutinde uygulanan tanı yöntemlerinin kontrolü amacı ile *Candida albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 kökenleri kullanıldı.

**Gram boyama:** Üreme sinyali veren şişelerden Gram boyama için preparat hazırlandı, Previ-Color (bioMérieux, Fransa) Gram boyama cihazı ile Gram

boyama yapıldı ve X100 büyütme ile ışık mikroskopunda değerlendirildi. Gram boyalı direkt mikroskopik bakıda maya hücrelerinin varlığının tür tanımlamasına katkı sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek amacıyla, Tablo 1'de tanımlandığı gibi kalitatif değerlendirme yapıldı.

**Dalmau plak yöntemi:** Sabouraud dekstroz agar besiyerinde üreyen maya kolonisi, iğne öze yardımı ile alındı. Mısır unu/tween-80 agar besiyeri üzerine uzunlamasına 4 paralel çizgi çizildi. Ekim çizgilerinin üzerine steril bir lamel yerleştirildi. Ekim plakları 30°C'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra ışık mikroskopunda X10-X40 büyütmede, iki farklı araştırmacı tarafından ayrı ayrı değerlendirildi ve mikromorfolojik özelliklerine göre mayaların tür tanımlaması yapıldı.

*Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* türlerinin benzerliği nedeni ile bu morfolojide gözlenen türlerin hepsine ısı deneyi yapıldı. 35 ve 45°C'de üreyenler *C. albicans*, 35°C'de üreyip, 45°C'de üremeyenler de *C. dubliniensis* olarak tanımlandı.

**MALDI-TOF MS yöntemi:** VITEK MS (Vitek MS server v.3.2 yazılımı) ile tüm izolatların SDA besiyerindeki 24 saatlik taze pasajları kullanıldı. MALDI-TOF MS yöntemi için önceden hazırlanan koloniler örnek tablasına çok az miktarda aktarıldı ve üzerine  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix damlatılarak fiksasyonu ve kristalizasyonu sağlandı.

Rutin laboratuvar iş akışında mayaların tanımlaması yapılan ve antibiyotik absorban içermeyen kan kültürü şişeleri (BacT/Alert FA-FN Plus, Biomerieux, Fransa) LF-MS yöntemi için hemen kullanılmayacak ise +4°C'de (en fazla 24 saat olmak koşuluyla) saklandı.

MALDI-TOF MS sonuçları Vitek-MS v.3.2 veri tabanında %99.0 güvenilirlikte otomatik olarak hesaplandı. Tanımlanamayan suşlar (güvenilirlik: <%60) için işlem tekrarlandı<sup>(3)</sup>. Üst üste 2 kez aynı sonuç elde edildikten sonra rapor edildi.

**LF-MS yöntemi:** Gram boyalı preparatta maya hücreleri görülen ve/veya maya mantarı üreyen kan kültür şişelerinden, lizis filtrasyon işlemi uygulandıktan

**Tablo 1. Gram boyalı preparatta maya hücrelerinin kalitatif değerlendirilmesi.**

0: Maya hücresi görülmedi.
1+: Tüm alanlarda 5' den az maya hücresi
2+: 2-3 alanda 1-5 maya hücresi
3+: Her alanda 5'den az maya hücresi
4+: Her alanda 5'den fazla maya hücresi

sonra MALDI-TOF MS (Vitek-MS, bioMérieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapıldı.

Lizis filtrasyon; pozitif kan kültürü şişesinden alınan 2 ml kan kültürü sıvısına 1 ml lizis solüsyonu (%0.6 Brij 97+ 0.4M CAPS, pH=11.7) eklenip beş saniye vorteks-lendi. Elde edilen lizat oda ısısında iki dakika bekletildikten sonra 2 cm çapında 0.45 µm por çaplı polietersülfon filtreden 40 sn boyunca damlatılarak vakum aspirasyon cihazı yardımıyla filtre edildi. Kalan pellet 3 ml yıkama solüsyonu (20 nM Sodyum fosfat + %0.05 Brij 97+ %0.45 NaCl, pH=7.2) ile üç kez yıkandı. Filtrede kalan rezidü pellet polyester başlıklı sürüntü çubuğuyla (Cleanmo TX743) MALDI-TOF MS tanımlama tablasına aktarıldı. Hücre duvarını parçalayarak protein ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla üzerine formik asit ilave edildi. Kuruyuncaya kadar bekledi. Daha sonra çalışmada matriks çözeltisi olarak 1µL VITEK MS-CHCA kullanıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Plak cihaz içine yerleştirilerek işlem başlatıldı<sup>(4)</sup>.

MALDI-TOF MS sonuçları Vitek-MS v.3.2 veri tabanında %99.0 güvenilirlikte otomatik olarak hesaplandı. Tanımlanamayan suşlar (güvenilirlik: <%60) tekrarlandı<sup>(3)</sup>. Üst üste en az 2 kez aynı sonuç elde edildikten sonra rapor edildi.

Kültür sonrası rutinde kullanılan Dalmau plak ve MALDI-TOF MS yöntemi ile elde edilen sonuçlar, LF-MS sonuçları ile karşılaştırıldı.

## BULGULAR

Dalmau Plak ve MALDI-TOF MS Yöntemi ile İdentifikasyon Sonuçları: Standart tanımlama yöntemleri (Dalmau Plak tekniği ve MALDI TOF MS) ile elde edilen sonuçlar birbiri ile %100 uyumlu olup, 100 *Candida* suşunun 37'si *C. albicans*, 23'ü *Candida*

**Tablo 2. Dalmau, MALDI-TOF MS ve LF-MS ile tanımlanan *Candida* türleri.**

<i>Candida</i> türleri	Dalmau Plak	MALDI TOF- MS	LF- MS	LF-MS ile "spektrum yetersizliği"
<i>Candida albicans</i>	37	37	26	11
<i>Candida parapsilosis</i>	23	23	9	14
<i>Candida tropicalis</i>	17	17	13	4
<i>Candida glabrata</i>	9	9	9	0
<i>Candida kefyfyr</i>	6	6	2	4
<i>Candida dubliniensis</i>	3	3	3	0
<i>Candida guilliermondii</i>	3	3	0	3
<i>Candida krusei</i>	2	2	2	0
Toplam	100	100	64	36

*parapsilosis*, 17'si *Candida tropicalis*, dokuzu *Candida glabrata*, altısı *Candida kefyfyr*, üçü *Candida guilliermondii*, üçü *Candida dubliniensis* ve ikisi *Candida krusei*, olarak tanımlanmıştır (Tablo 2).

LF- MS ile İdentifikasyon Sonuçları: LF- MS ile 100 *Candida* türünün 64'ü %99 güvenilirlik düzeyinde tanımlanmıştır. Bunların 26'sı *C. albicans*, dokuzu *C. parapsilosis*, 13'ü *C. tropicalis*, dokuzu *C. glabrata*, ikisi *C. kefyfyr*, ikisi *C. krusei*, üçü *C. dubliniensis* olarak gözlenmiştir. *Candida* türlerinin 36'sı bu yöntemle "spektrum yetersizliği" nedeni ile tanımlanamamıştır. Bu şişelerden ikinci kez çalışıldığında da benzer sonuçlar alınmıştır (Tablo 2). Spektrum yetersizliği *C. parapsilosis* (14/23; %60.8), *C. albicans* (11/37; %29.7), *C. tropicalis* (4/17; %23.5), *C. kefyfyr* (4/6; %66.6) ve *C. guilliermondii* (3/3; %100) kökenlerinde görülmüştür.

Gram boyama sonuçlarının LF- MS ile karşılaştırılması: Gram boyalı preparatlarda gözlenen kalitatif maya yoğunluğu ile LF-MS yönteminin tanımlaması arasındaki ilişki Tablo 3'de gösterilmiştir.

Spektrum yetersizliği gözlenen 36 suşun ürettiği kan kültür şişelerinde, Gram boyamada maya hücreleri yoğunluğunun düşük olduğu (0-1) gözlenmiştir. Gram boyamada "0" olarak değerlendirilen izolatlarda identifikasyon sonucu %40; "1" olarak değerlendirilenlerde identifikasyon sonucu %55.3; "2" olarak değerlendirilenlerde %73.3; "3" olarak değerlendirilenlerde %100 ve "4" olarak değerlendirilenlerde %90.9 olarak bulunmuştur.

Tablo 3. LF- MS sonuçlarının Previ Color Gram boyama sonuçlarıyla karşılaştırılması.

Tanımlanan türler		Kalitatif Gram Boyama					Toplam
		0	1	2	3	4	
<i>Candida albicans</i>	LF-MS	3	12	5	4	2	26
	SY	1	9	0	0	1	11
<i>Candida parapsilosis</i>	LF-MS	1	4	0	4	0	9
	SY	3	8	3	0	0	14
<i>Candida tropicalis</i>	LF-MS	3	6	1	1	2	13
	SY	3	0	1	0	0	4
<i>Candida glabrata</i>	LF-MS	1	2	5	0	1	9
	SY	0	0	0	0	0	0
<i>Candida kefyr</i>	LF-MS	0	2	0	0	0	2
	SY	3	1	0	0	0	4
<i>Candida krusei</i>	LF-MS	0	0	0	0	2	2
	SY	0	0	0	0	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	LF-MS	0	0	0	0	0	0
	SY	2	1	0	0	0	3
<i>Candida dubliniensis</i>	LF-MS	0	0	0	0	3	3
	SY	0	0	0	0	0	0
Toplam	LF-MS	8 (%40)	26 (%55.3)	11 (%73.3)	9 (%100)	10 (%90.9)	64 (%64)
	SY	12	19	4	0	1	36

## TARTIŞMA

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, hasta örneklerinde üreyen mayaların tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntemler ve geliştirilen çeşitli ticari yöntemlerin avantaj ve dezavantajları olmakla birlikte, bu yöntemlerle tür düzeyinde tanı en erken 48-72 saatte gerçekleşmektedir. Bu çalışmada uygulanan LF-MS yöntemi, basit ve kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem olup, mevcut tanımlama yöntemlerine göre en az 48 saat avantaj sağlamaktadır.

*Candida* türlerinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin tanımlanması sıklıkla fenotipik özelliklerine göre yapılmaktadır. Bunlar germ tüp, mısır unu tween 80 agardaki morfolojik görünümü gibi konvansiyonel yöntemler ile ticari olarak bulunan çeşitli asimilasyon ve fermentasyon testleridir. Konvansiyonel yöntemler basit ve ucuzdur. Ancak zaman alıcı olmaları, deneyim gerektirmesi ve iyi derecede mikroskopik gözlem becerisine sahip olunması gibi bazı dezavantajlara da sahiptir. Ticari testler özel bir deneyim gerektirmemekle birlikte, tanımlama süresini kısalt-

mamaktadır. Son yıllarda moleküler temelli testler epidemiyolojik ve araştırma amaçlı olarak mantarların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Doğru sonuç verebilen ancak zaman alıcı, pahalı ve henüz standardize olmayan bu yöntemler de teknik olarak rutin kullanıma uygun değildir<sup>(5)</sup>.

Klinik laboratuvarlarında maya izolatlarını tanımlamak için kullanılan konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında, MALDI-TOF MS ile çok daha kısa sürede, daha az malzeme ile maliyet etkin ve giderek büyüyen veri tabanı sayesinde daha doğru tanımlamalar yapılabileceği öne sürülmektedir<sup>(6,7)</sup>. MALDI-TOF MS yöntemi ile konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı, ekonomik ve daha güvenilir sonuçlar alındığını gösteren çeşitli çalışmalar vardır. MALDI-TOF MS'in çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizm yöntemi (AFLP) ile doğrulamasının yapıldığı bir çalışmada *C. parapsilosis* complex (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*) ve *Lodderomyces elongisporus* izolatlarının her iki yöntemle de doğru tanımlandığı; biyokimyasal yöntemlerle birbirinden ayıramayan ve direnç profillerinde farklılık bulunan *Candida*

*ortho/meta/parapsilosis, Candida glabrata/bracarensis/nivariensis, C. albicans/ dubliniensis* gibi genetik olarak yakın ilişkili türlerin veya fenotipik olarak birbirine çok benzeyen *Candida famata* ile *Candida guilliermondii* gibi türlerin bu yöntemle doğru bir şekilde tanımlandığı bildirilmiştir<sup>(8-10)</sup>.

Kim ve ark.<sup>(11)</sup>, 2014'te yaptıkları çalışmada Vitek-2 ile *C. famata* olarak tanımlanan 26 *Candida* izolatının doğrulaması için MALDI-TOF MS ve gen sekans analizini kullanmışlardır. Çalışmada Vitek-2'nin *C. famata* olarak tanımladığı kökenlerin gen sekans analizinde *C. guilliermondii* ile %100 homoloji gösterdiği, MALDI-TOF MS'in ise çalışılan 26 suştan 21'ini doğru tanımladığı, dört izolatın ise tanımlanamadığı bildirilmiştir. Pinto ve ark.<sup>(10)</sup>, Bruker sistemi ile yaptıkları araştırmalarında ekstraksiyon yapılmadan direkt yayma ile spektrum oluşmadığını ya da kabul edilemez düşüklükte spektrumlar oluştuğunu tespit etmişlerdir. van Herendael ve ark.<sup>(12)</sup>, basitleştirilmiş ekstraksiyonla tanımlama yapmayı değerlendirmişler ancak 28 izolatın sınır değerinin, güvenilir tanımlama için minimum cut off değerinin (1.7 cut off) altında olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada da LF-MS ile spektrum yetersizliği sonucu ile bazı izolatlar (%36) tanımlanamamıştır. Bunun aksine, prosedürlere uyularak yapılan klasik MALDI-TOF MS yönteminde türler mükemmel düzeyde tanımlanmıştır.

Van Belkum ve ark.<sup>(13)</sup>, MALDI-TOF MS yönteminin, klinik örnekler üzerinde doğrudan gerçekleştirilemeyeceğini klinik örnekte bulunan az sayıda mikroorganizmanın, doğru spektrum elde edilmesine izin vermeyeceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte, kan kültüründe zenginleştirmeden sonra tanımlamanın mümkün hale gelebileceği, konsantrasyon ve ekstraksiyon için lizis filtrasyon ya da santrifüjle muamele edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, üreme sinyali gösteren şişelerden öncelikli olarak Gram boyalı preparat hazırlanmış ve maya hücreleri görülenlerden yoğunlaştırma amacıyla direkt LF yapılarak MALDI-TOF MS yöntemi uygulanmıştır. Her şişeden yapılan Gram boyalı preparatlarda maya yoğunluğunun farklı olması nedeni ile 0 ile +4 arasında kalitatif skorlama yapılmıştır. Van Belkum ve ark.'ları<sup>(13)</sup> tarafından ileri sürülen maya yoğunluğunun tanımlamada

önemli olduğu düşüncesi bu çalışmada da gözlenmiştir. Gram boyamada skorun "0" olduğu şişelerdeki izolatlarda doğru tanımlama oranı %40 iken, maya yoğunluğunun artması ile oran %100'lere yükselmiştir.

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında kan kültüründe üreme sinyali veren şişelerin kanlı agar, EMB agar ve SDA besiyerlerindeki subkültürlerinde maya üreyen kolonilerden, çalışmalarda da önerildiği gibi birden fazla yöntemle (Dalmau yöntemi ve MALDI-TOFMS) tür tanımlaması yapılmaktadır<sup>(6)</sup>. Kullanımda olan dört farklı MALDI-TOF MS sistemi vardır. Bunlardan VITEK MS (Vitek MS server v.1.2 yazılımı) ve Bruker sisteminin identifikasyon performanslarını karşılaştıran bir çalışmada, VITEK MS ve Bruker sistemlerinin, tıbbi önemi olan ve sık karşılaşılan mayalarda doğru tanımlama oranlarının yüksek, nadir görülen mayalarda ise VITEK MS yönteminin tanımlama oranının daha düşük ve yanlış tanımlama oranının da daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>(14)</sup>. Bu çalışmada kullanılan sistem VITEK MS'tir. Çalışmadaki tür çeşidi sayısı (sekiz) az olmakla birlikte, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve *C. dubliniensis* gibi tanımlamada sorun yaşanan türler konvansiyonel yöntemle uyumlu olacak şekilde doğru tanımlanmıştır.

İlk kez Fothergill A ve ark.<sup>(4)</sup> tarafından pozitif sinyal veren Vitek MS, BacT / Alert şişelerinden bir miktar alınan kan kültürü sıvısının oda sıcaklığında 2-4 dakika süreyle lizis tamponu ile inkübe edildikten sonra elde edilen lizatın filtrelenerek, mikroorganizmaların toplanması ve Vitek MS ile tanımlanması esasına dayanan, bakteri ve maya türlerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasını amaçlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Vitek MS ile çalışmaya dahil edilen 259 şişenin 189 (%73)'unda mikroorganizma tür seviyesinde tanımlanırken, 51 (%19.7)'inde tanımlanamamış, altısında (%2.3) yanlış tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu yöntemin avantajının; santrifüj gerektirmemesi, 15 dakikadan daha kısa bir sürede Vitek MS analizi için temiz bir spektrum üretmesi ve mikroorganizmaları doğrudan pozitif kan kültür şişelerinden tanımlaması olduğunu ileri sürmüşlerdir. Lizis sonrası direkt kan kültür

şişesinden mayaların santrifüj edilmesi ile elde edilen, *Candida*'ların tür tanısında farklı protokoller ve farklı eşik değerlerin kullanıldığı çalışmalar da vardır<sup>(7,15-17)</sup>.

Bu çalışmada, Dalmau plak yöntemi ve MALDI-TOF MS yönteminde birbiri ile %100 uyumlu olacak şekilde tanımlanan türlerin 64'ünde LF-MS ile %99 güvenilirlikte tanımlama gerçekleşmiştir. Kalan 36 köken "spektrum yetersizliği" nedeniyle tanımlanamamıştır (Tablo 2). Fothergill A ve ark.'nın<sup>(4)</sup> çalışmalarında belirtilen tür düzeyinde tanımlama başarısı bu çalışma ile benzer olup; bu çalışmada da "tanımlanamayan" türler bulunmaktadır. "Spektrum yetersizliği" olarak tanımlama dışı kalan suşlar, aslında veri tabanında yer alan türlerden oluşmaktadır. Bu değişken, analiz dışı bırakıldığında tanımlama yapılan 64 *Candida* türünün standart yöntemlerle %100 uyumlu olacak şekilde tanımlama yaptığı ve bu yöntemin subkültür gerektiren MALDI-TOF MS yöntemine göre en az 48 saat, Dalmau yöntemine göre de en az 72 saat avantaj sağladığı görülmüştür.

Lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yöntemi 100 izolata uygulanmış, 36'sı spektrum yetersizliğinden kaynaklanan identifikasyon problemi nedeniyle hiç tanımlanamamıştır (Tablo 2). Ancak bu türler subkültür sonrası yapılan MALDI-TOF MS ile tanımlanan ve veri tabanındaki spektrumda yer alan türlerdir. Ayrıca bu sorun çalışmada saptanan sekiz türden altısında gözlemlendiği için, türlerle ilişkilendirilemeyecek bir durumdur. Elde edilen veriler, Gram boyama ile elde edilen kalitatif maya yoğunluğu sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde (Tablo 3), tanımlamadaki sorunun maya yoğunluğu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür ve tanımlanan 64 izolatta elde edilen sonuçlar konvansiyonel yöntemle %100 uyumlu bulunmuştur.

Kan kültürü şişelerinde pozitif sinyal sonrası Gram boyalı preparatta her sahada maya hücrelerinin görülmesi durumunda, LF-MS yönteminin kullanılabilmesi düşünülmüştür. Ancak maya yoğunluğu az ise, LF-MS yönteminin başarısız olabileceği akılda tutulmalı ve uygulanmamalıdır. MALDI-TOF MS yönteminde tanımlamanın doğru yapılabilmesi, yeterli spekt-

rumun elde edilebilmesi için teknik prosedür ve gerekliliklerin doğru uygulanmasının yanında maya hücre yoğunluğunun da önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmadaki veriler, tür çeşitliliğinin ve çalışılan örnek sayısının az olması nedeni ile daha geniş bir yorum yapmayı engellemektedir. Spektrum yetersizliğinden kaynaklanan tanımlama probleminin çözülmesine yönelik, daha fazla türü kapsayacak şekilde daha yüksek sayıda örnek içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik Kurulu tarafından (26.08.2021 tarih ve 21-8T/33 No.) onaylanmıştır.

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

**Ethics Committee Approval:** The study protocol was approved by the Ege University, Medical Faculty, Ethics Committee (08.26.2021, 21-8T/33).

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

## KAYNAKLAR

1. Groll AH. Invasive opportunistic mycoses: clinical trials review, 2007-2008. *Curr Infect Dis Rep.* 2008;10(6): 451-3.  
<https://doi.org/10.1007/s11908-008-0073-0>
2. Yeğenoğlu Y. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi.* 2011;70(1):23-8.
3. Lee H-S, Shin JH, Choi MJ, et al. Comparison of the Bruker Biotyper and VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry systems using a formic acid extraction method to identify common and uncommon yeast isolates. *Ann Lab Med.* 2017;37(3):223-30.  
<https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.3.223>
4. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YFW. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3): 805-9.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02326-12>
5. Durán-Valle MT, Sanz-Rodríguez N, Muñoz-Paraiso C,

- Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL. Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32 C. *Sabouraudia*. 2014;52(4):342-9. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt036>
6. Keceli SA, Dundar D, Tamer GS. Comparison of Vitek Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry versus conventional methods in *Candida* identification. *Mycopathologia*. 2016;181(1-2):67-73. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9944-8>
  7. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2012;50(1):176-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.05742-11>
  8. Carolis ED, Hensgens LA, Vella A, et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Sabouraudia*. 2014;52(2):123-30. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt009>
  9. Ece G, Samlioglu P, Akkoçlu G, Atalay S, Kose S. The evaluation of the distribution of yeast like fungi '*Candida* Species' at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci*. 2012;9(7):617-20. <https://doi.org/10.7150/ijms.4707>
  10. Pinto A, Halliday C, Zahra M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One*. 2011;6(10):e25712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025712>
  11. Kim SH, Shin JH, Mok JH, et al. Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among strains isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. *BioMed Res Int*. 2014;2014:250408. <https://doi.org/10.1155/2014/250408>
  12. Van Herendael B, Bruynseels P, Bensaid M, et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(5):841-8. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1383-y>
  13. Van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier J-P, Girard V. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Ann Lab Med*. 2017;37(6): 475-83. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.475>
  14. Mancini N, De Carolis E, Infurnari L, et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2453-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00841-13>
  15. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol*. 2018;9:1097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01097>
  16. Idelevich EA, Grunewald CM, Wüllenweber J, Becker K. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2. *PLoS One*. 2014;9(12):e114834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114834>
  17. Vecchione A, Florio W, Celandroni F, Barnini S, Lupetti A, Ghelardi E. A rapid procedure for identification and antifungal susceptibility testing of yeasts from positive blood cultures. *Front Microbiol*. 2018;9:2400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02400>

- A**  
 Agarda dilüsyon, 109  
 Anaerop bakteri, 197  
 Anti-nükleer antikorlar, 393  
 Antibiyotik direnci,  
 15,233,254,295,341  
 Antibiyotik direnç profilleri, 180  
 Antibiyotik duyarlılık testi, 348  
 Antibiyotik duyarlılık testleri, 341  
 Antifungal direnç, 150  
 Antifungal ilaçlar, 326  
 Antimikrobiyal duyarlılık testi, 348  
 Antimikrobiyal duyarlılık, 239  
 Antitüberküloz ilaç duyarlılığı, 172  
 Aromaterapötik gül uçucu yağı, 245  
 Aspergilloz, 326  
 Atık su bazlı epidemiyoloji, 309  
 Atipik seroloji, 263
- B**  
*Bacterioides fragilis* grubu bakteriler, 109  
 Bakteriyofaj, 156  
 Beta Hemolitik Streptokoklar (BHS), 180  
 Bibliyometri, 70  
 Blastocystis, 354  
 Biyofilm, 245,406  
 Bronkoalveolar lavaj, 225
- C**  
*Candida albicans*, 50, 163  
*Candida parapsilosis* tür kompleksi, 400  
*Candida parapsilosis*, 11  
*Candida* spp, 288,421  
 Cinsel yolla bulaşan hastalıklar, 119  
 COVID-19, 99, 214  
 CRISPR, 99  
*Cryptosporidium* spp., 354  
*Cryptosporidium*, 354
- D**  
 Devam sütü, 1  
 DFS70, 393  
 Disk difüzyon, 109  
 Döner garnitürleri, 276
- E**  
 Eğirdir gölü, 354  
 Ek gıda, 1  
 Enfeksiyon hastalıkları, 214  
 Enflamasyon, 393  
 Enterik bakteriler, 373
- Enterobacterales*, 375  
 Epidemiyoloji, 348  
*ermF* geni, 23
- F**  
 Faj tedavisi, 156  
 Farkındalık, 295  
 Filtrasyon, 368,421  
 Fosfolipaz, 50  
 Fungerp, 326
- G**  
 Gebe, 126  
 Genotip, 303  
 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR), 126  
 Germ tüp, 288  
*Giardia intestinalis*, 354  
*Giardia* spp., 354  
 Gradient test, 143  
 Grup B streptokok, 239
- H**  
*H. pylori* dışı antijen testi, 61  
 Halk sağlığı, 309  
 Hastalık, 89  
 Hastane enfeksiyonu, 254  
 HCV, 303  
*Helicobacter pylori*, 61  
 Hepatik B, 263  
 Hepatitis B, 263  
 HIV, 119  
 HPV, 119  
 Human Parvovirus B19, 126
- I**  
 IIF-ANA, 393
- İ**  
 İlk sıra ilaçlar, 172  
 İmmünoelot, 393  
 İn silico analiz, 415  
 İzole anti-HBc pozitifliği, 263
- K**  
 Kan kültürü, 348  
 Kandidemi, 150, 288  
 Kandidoz, 326  
 Karbapenem dirençli *K.pneumoniae*, 33  
 Karbapenemaz, 375  
 Klindamisin, 23  
 Klinik ve tanı, 203  
 Klonal ilişki, 33
- Konjonktival mikrobiyota, 406  
 Kontakt lens, 406  
 KPC, 375  
 Kümülatif antibiyogram, 373  
 Kütle spektrometrisi, 421
- L**  
 Latent tüberküloz, 271  
 Levofloksasin, 334  
*Lodderomyces elongisporus*, 400
- M**  
 MALDI-TOF MS, 400  
 MALDI-TOF, 421  
 Mantar hücre duvarı, 326  
 Matrix-yardımlı laser desorpsiyon-ionizasyon kütle spektrometrisi, 288,368  
 Metisilin direnci, 15  
 Metronidazole direnç, 197  
 Mikroarray analizi, 368  
 Mikrobiyolojik kalite, 1,276  
 Moleküler tanı, 400  
 Moleküler tiplendirme, 33  
 MRSA, 233  
 MTL lokus, 11  
 MTLa idiomorf, 11  
 Multipleks PZR, 354  
*Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, 172
- N**  
 Nim genleri, 197  
 Nonfermentatif bakteriler, 373  
 Nozokomiyal enjeksiyon, 150  
 Nozokomiyal, 42
- O**  
 O157: H7, 415
- P**  
 Pandemi, 214  
 Patogenez, 203  
 Patojen 1,  
 PCR, 303  
 Pediatri, 42  
 Penisilin, 239  
*Pneumocystis jirovecii*, 225  
*Pneumocystis* pnömonisi, 225  
 Polimeraz zincir reaksiyonu, 70  
 Polimikrobiyal biyofilm, 163  
 Prevalans, 61  
 PZR, 303

**R**

RSV, 42  
RT-PCR, 50,99  
RT-PZT, 50

**S**

Sağlık, 1  
SARS-CoV-1, 99,203,309  
SARS-CoV-2, 99,203  
Sepsis, 368  
Serolojik testler, 99  
Solunum yolu enfeksiyonu, 42  
*Staphylococcus aureus*, 15, 233  
*Staphylococcus*, 156  
STEC, 415  
*Stenotrophomonas maltophilia*, 334

Süpernatant, 163

**T**

Tanı, 354  
Tek sağlık, 341  
Tet geni, 23  
Tetrasiklin, 24  
Tigesiklin, 23  
Tonsillofarenjit, 180  
Trimetoprim-sülfametoksazol, 334  
Tutum, 295  
Tüberkülin deri testi, 271

**Ü**

Üriner sistem enjeksiyonu, 254  
Üzüm sirkesinin antibakteriyel etkisi, 276

**V**

VanA, 143  
VanB, 143  
VanC, 143  
Vancomycin resistant  
Enterococci, 143  
Vankomisine dirençli  
Enterokok, 143  
Viral santral sinir sistemi  
enfeksiyonu, 70  
Virobiyota, 89  
Virom, 89  
Virülans genleri, 415

## SUBJECT INDEX

**Volume 51, 2021****A**

Agar dilution method, 109  
Anaerob bacteria, 197  
Anti-nuclear antibodies, 393  
Antibacterial effect of grape vinegar,  
276  
Antibiotic resistance profiles, 180  
Antibiotic resistance, 15,233,254,295,341  
Antibiotic susceptibility testing, 348  
Antibiotic susceptibility tests, 348  
Antifungal agents, 326  
Antifungal resistance, 150  
Antimicrobial susceptibility  
testing, 339  
Antimicrobial susceptibility, 239  
Antituberculosis drug  
susceptibility, 172  
Aromaterapeutic rose essential oil,  
245  
Aspergillosis, 326  
Attitude, 295  
Atypical serology, 263  
Awareness, 295

**B**

Bacteriological pollution, 132  
Bacteriophage, 156  
*Bacteroides fragilis* group bacteria,  
109  
Bacteroides, 23  
Bathing water quality, 132  
Beta-Hemolytic Streptococci  
(BHS), 180  
Bibliometrics, 20

Biofilm, 245,406  
Blastocystis, 354  
Blood culture, 348  
Bronchoalveolar lavage, 225

**C**

*Candida albicans*, 50,163  
*Candida parapsilosis* species  
complex, 400  
*Candida parapsilosis* tür  
kompleksi, 391  
*Candida parapsilosis*, 11  
*Candida* spp, 288,421  
*Candidemia*, 150,288  
Candidiasis, 326  
Carbapenem-resistant  
*K.pneumoniae*, 33  
Carbapenemase, 375  
Clindamycin, 23  
Clonal relationship, 33  
Coliform bacteria, 132  
Communicable diseases, 214  
Conjunctival microbiota, 406  
Contact lenses, 406  
COVID-19,99,214  
CRISPR, 99  
*Cryptosporidium* spp., 354  
*Cryptosporidium*, 354,363  
Cumulative antibiogram, 373

**D**

DFS70, 393  
Diagnosis, 203, 354  
Disc diffusion method, 109

Disease, 89  
Doner garnishes, 276

**E**

Enteric bacteria, 373  
Enterobacterales, 348,375  
Epidemiology, 348  
*ermF* gene, 23

**F**

Filtration, 368,241  
First line drugs, 172  
Follow-on milk, 1  
Fungal cell wall, 326  
Fungerp, 326

**G**

Genotype, 303  
*Giardia intestinalis*, 354  
*Giardia* spp., 354,363  
Gradient test, 143  
Group B streptococcus, 239

**H**

*H. pylori* stool antigen test, 61  
HCV, 303  
Health, 1  
*Helicobacter pylori*, 61  
Hepatitis B, 263  
HIV, 119  
Hospital infection, 254  
HPV, 119  
Human Parvovirus B19, 126



**I**

IIF-ANA, 393  
Immunoblot, 393  
inflammation, 393  
In silico analysis, 415  
Isolated anti-HBV positivity, 263

**K**

KPC, 375

**L**

Lake Eğirdir, 363  
Latent tuberculosis, 271  
Levofloxacin, 334  
Lodderomyces elongisporus, 400

**M**

MALDI-TOF MS, 400  
MALDI-TOF, 421  
Mass Spectrometry, 421  
Matrix-assisted laser desorption  
ionization mass spectrometry,  
288,368  
Methicillin resistance, 15  
Metronidazole resistance, 197  
Microarray analysis, 368  
Microbiological quality, 1, 276  
Molecular Identification, 400  
Molecular typing, 33  
MRSA, 233  
MTL locus, 11  
MTLa idiomorph, 11  
Multiplex PCR, 354  
*Mycobacterium tuberculosis*  
complex, 172

**N**

*Nim* genes, 197  
Nonfermentative bacteria, 373

Nosocomial infection, 150  
Nosocomial, 42

**O**

O157: H7, 415  
One health, 341

**P**

Pandemics, 214  
Pathogen, 1  
PCR, 303  
Penicillin, 239  
Phage therapy, 156  
Phospholipase, 50  
*Pneumocystis jirovecii*, 225  
*Pneumocystis pneumonia*, 225  
Polymerase chain reaction, 70  
Polymicrobial biofilm, 163  
Pregnant, 126  
Prevalance, 61  
Pthogenesis, 203  
Public health, 132, 309

**Q**

Quantiferon, 271  
Quorum sensing, 245

**R**

Real-time PCR, 119  
Real-time polimerase chain  
reaction (Real Time PCR)  
Respiratory tract infection, 42  
RSV, 42  
RT-PCR, 50, 99

**S**

SARS-CoV-1, 99,203,309  
SARS-CoV-2, 309  
Sepsis, 368

Serological tests, 99  
Sexually transmitted diseases, 119  
*Staphylococcus aureus*, 15, 233  
*Staphylococcus*, 156  
STEC, 415  
*Stenotrophomonas maltophilia*, 334  
Supernatant, 163  
Supplementary food, 1

**T**

Tet gene, 23  
Tetracyclin, 23  
Tigecycline, 23  
Tonsillopharyngitis, 180  
Trimethoprim-sulfamethoxazole,  
334  
Trimetoprim-sulfametoksazol, 325  
Tuberculin skin test, 271

**U**

Urinary tract infections, 254

**V**

VanA, 143  
VanB, 143  
VanC, 143  
Vancomycin resistant Enterococci,  
143  
Viral central nervous system  
infection, 70  
Virobiota, 89  
Virome, 89  
Virulence gene, 415

**W**

Wastewater based epidemiology,  
309

# YAZAR DİZİNİ / AUTHORS INDEX

## Cilt/Volume 51, 2021

<b>A</b>	Borsa BA, 397	<b>E</b>	Hancı S, 150
Adaleti R, 15	Bozdayı G, 85,89,126	Eminoğlu S, 23, 109	Hilmioğlu Polat S, 11,142
Ağca H, 303	Bozdemir T, 119	Ener B, 225, 303	
Akçın R, 263	Bölük Sabuncu S, 354	Er H, 150	<b>İ</b>
Akdoğan H, 203		Eraç B, 99	İlkit M, 11,317,391
Akkuş S, 61, 263	<b>C</b>	Erdönmez D, 245	İnan D, 42
Akman N, 295	Cihan M, 61, 263	Eren S, 412	İrdem Ş, 143
Aksoy R, 384		Ergin Ç, 189	İskeleli G, 406
Akyar I, 345	<b>Ç</b>	Ergin S, 397	
Alkaya D, 391	Çağatay P, 397	Ergon MC, 366	<b>K</b>
Altanlar N, 288	Çalışkan E, 254	Ergunay K, 85	Kansak N, 15
Altay Koçak A, 85,126	Çeken N, 233	Esen B, 373	Kaplan E, 391
Altuğlu İ, 119	Çiçek C, 70, 119	Esen N, 172	Karaca Derici Y, 150
Altun M, 180	Çolak D, 42	Esenkaya Taşbent F, 325	Karahan ZC, 332
Alver O, 225	Çolak M, 126	Evren K, 239	Karakoyun AS, 317,391
Apaydın Yağcı M, 354	Çopur ŞS, 150	Fidan I, 89, 126	Karataş A, 397
Aral M, 271			Karçaaltıncaba D, 126
Arslan A, 359	<b>D</b>	<b>G</b>	Karslıgil T, 203
Arslan GK, 325	Dalyan Cilo B, 225	Gareayaghi N, 61,263	Kartal E, 70
Arslan N, 172	Demir C, 373	Genç E, 1	Kaskatepe B, 332
Aslan B, 61	Demiray Gürbüz E, 33,	Girginkardeşler N, 345	Kaya S, 254
Aslan G, 214	50	Gökengin D, 119	Kaygusuz A, 397
Ateş A, 99	Demirci M, 397,406	Gökkılıç B, 70	Kazak E, 225
Atik TK, 233	Demirdöğen E, 225	Görgün S, 345	Keskin BH, 254
Atmaca S, 197	Diñ B, 239	Görzer I, 85	Kıratlı Yılmazçoban N,
Aydemir SŞ, 119	Diñ HÖ, 61,263	Güdücüoğlu H, 132,143	309
Aydemir Ş, 359	Doğan M, 331	Gülay Z, 33	Kıyan M, 156
Aydın E, 132	Doğaner A, 271	Günay N, 42	Kilimcioğlu AA, 345
	Doluca Dereli M, 50	Güngördü Dalar Z, 397	Koca U, 245
<b>B</b>	Döğen A, 391	Gür D, 332	Kocagöz T, 345
Bahar Tokman H, 397	Duran H, 233	Gürbüz M, 373	Kocazeybek BS,
Bali EB, 245	Dursun O, 42		61,263,397
Bayram Y, 132, 143	Düşen S, 354	<b>H</b>	Köse T, 119
Bilen S, 143	Düzyol Azak D, 345	Hacıoğlu M, 163	Kurt Ö, 345

Kuşkucu MA, 263,397  
Küçük B, 271

## M

Mamal Torun M, 397  
Mart Kömürcü SZ, 15  
Meriçli Yapıcı B, 180  
Metin B, 11  
Metin DY, 412  
Midilli K, 397  
Mirza HS, 339  
Mutlu D, 42

## O

Okalin ŞŞ, 366  
Orak F, 271  
Oyardı Ö, 163  
Oygür N, 42  
Oyur T, 345

## Ö

Öktem İMA, 366  
Önal U, 119  
Öngüt G, 42  
Özbey D, 61, 263  
Özbilgin A, 345  
Özkalay Yılmaz N, 150

Özkarataş MH, 172  
Özkocaman V, 225  
Özkütük A, 172

## P

Parlak M, 132,143  
Pelit S, 397  
Puchhammer-Stöckl E,  
85  
Pullukçu H, 119

## R

Rağbetli C, 143

## S

Sağlam T, 354  
Sağlık İ, 42, 303  
Sancak S, 339  
Sarı AN, 33  
Sarı Kaygısız AN, 366  
Sarıbaş S, 263  
Sarıgüzel FM, 239  
Sarınoğlu R, 42  
Say İ, 271  
Sayın E, 23, 109  
Sirekbasan S, 263  
Soylu M, 359

Süzük Yıldız S, 332

## Ş

Şahin F, 156  
Şanlı K, 15  
Şimşek H, 332

## T

Taner Z, 397  
Tekeş B, 23,109  
Temel A, 99  
Tokman HB, 61,263  
Tunç B, 50  
Tüney İ, 85  
Tünger A, 359  
Türkecul Şen E, 373  
Tüzemen NÜ, 225

## U

Ulusan Bağcı Ö, 156  
Us E, 384  
Usubütün A, 85  
Uyanık Parlak A, 143

## Ü

Ülger Toprak N, 23,109  
Ünal N, 391

Ünalı Ö, 332  
Ünver Alçay A, 276

## V

Vural A, 1

## Y

Yağcı A, 4543  
Yakupoğulları Y, 143  
Yapıcı G, 14  
Yardibi Demir HA, 239  
Yaşar M, 11  
Yavuz M, 245  
Yıldız S, 332  
Yılmaz K, 288  
Yiğın A, 406  
Yiş R, 33  
Yüce K, 85

## Z

Zeyrek FY, 406  
Zeytinoğlu A, 70  
Ziver Sarp T, 61  
Ziver T, 263

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

## Örnekler

### A. Makaleler

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

- **Standart Dergi Makalesi:** Standart Dergi Makalesi: Courvalin P, Davies J. Mechanisms of resistance to aminoglycosides. Am J Med. 1977;62(6):868-72. <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.

