

Cilt / Volume 52

Sayı / Number 1

Mart / March 2022

ISSN 0258-2171

e-ISSN 2458-7516



Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✓ Baharat ve Yenebilir Bitkilerin Probiyotik Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkileri
- ✓ Serviks Dokularında HPV DNA Pozitifliği ve Osteopontin Düzeyi Arasındaki İlişkinin Araştırılması
- ✓ İzmir İlinde Gebelerde Sitomegalovirüs (CMV) IgG ve IgM Antikorlarının Seroprevalansı: CMV IgG Avidite Testlerinin Analizi
- ✓ Trakeal Aspirat Örneğinden İzole Edilen Ender Bir Etken: *Brevundimonas vesicularis*

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY



Cilt / Volume 52

Sayı / Number 1

Mart / March 2022



TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 52 Sayı / Number 1 Mart / March 2022

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

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 Gümrall; 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 Avclar, İstanbul
0000-0001-6927-9917

Nüket Sivri; İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı, İstanbul
0000-0002-4269-5950

Serap Süzük Yıldız; Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ankara, Türkiye
0000-0002-4820-6986

Sahibi / Owner

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

Prof. Dr. Sebahat Aksaray

Yazışma Adresi / Correspondence Address

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: tmcdeditor@gmail.com
www.tmc-online.org

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

© 2022. 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 İhkeleri'ne uymaktadır.

© 2022. 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: Yaygın Süreli

Yayıncılık Hizmetleri / Publishing Services

Akdema Bilişim Yayıncılık ve Dan. Tic. Ltd. Şti.
Adres: Balkiraz Mah. Saraycık Cad. No: 19/6 Mamak/Ankara
Sertifika no: 52576
E-posta: bilgi@akdema.com
Tel: +90 533 166 80 80
Web: www.akdema.com

Baskı / Printing

Teknoart Digital Ofset Reklamcılık Matbaacılık İth. İhr. San. ve Tic. Ltd. Şti.
Adres: Cevizlidere Mahallesi 1288 Sok. No: 1/1 Çankaya/Ankara
Sertifika no: 47644
Tel: +90 312 473 92 97
Web: www.printandsmile.com.tr

Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

Ahmet Özbilgin, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa
0000-0003-3613-8741

Ahmet Yılmaz Çoban, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Toplum Beslenmesi Anabilim Dalı, Antalya
0000-0002-8815-6063

Ali Aydın, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0002-4931-9843

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

Aynur Karadenizli, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli
0000-0002-8267-5284

Ayşe Aydan Özkütük, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-1710-2287

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

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

Cengiz Çavuşoğlu, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0001-7152-5216

Çiğdem Sezer, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kars
0000-0002-9722-3280

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

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

Erdal Özbek, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır
0000-0002-8593-224X

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

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

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

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

Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-1221-7907

Gülşay Aral Akarsu, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara
0000-0003-0007-9006

Hatice Ertabaklar, Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın
0000-0001-7997-6433

Hatice Yazısız, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya
0000-0002-7285-4764

Hüseyin Gündüçoğlu, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van
0000-0003-1101-9017

İdil Ünal, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-1639-277X

İlknur Kaleli, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli
0000-0001-9689-8297

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

İsmail Ceyhan, Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir
0000-0002-6154-7961

Danışmanlar Kurulu / Advisory Board

Kayhan Çağlar, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0001-7257-6453

Melda Özdamar, Anadolu Sağlık Merkezi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kocaeli
0000-0003-3532-9255

Meral Dilara Ögünç, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya
0000-0001-6669-6811

Mustafa Altındış, Sakarya Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya
0000-0003-0411-9669

Nilgün Çerikçioğlu, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0002-7554-4366

Oğuz Reşat Sipahi, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-1243-2746

Özgen Alpay Özbek, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0003-4415-7205

Özgen Köseoğlu Eser, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0002-2552-7971

Rabia Can Sarınoğlu, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0001-9222-8659

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

Seda Tezcan Ülger, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
0000-0002-0823-3680

Sevim Meşe, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0001-5944-0180

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

Yasemin Heper, Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa
0000-0002-6635-5416

Zayre Erturan, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0002-6427-3046

Zeynep Gülay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0002-4135-9154



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

DERLEME / REVIEW

- **Baharat ve Yenebilir Bitkilerin Probiyotik Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkileri**
Antimicrobial Effects of Plants and Spices on Probiotic Bacteria
Aysun Sağlam, Nagihan Çağlar, Ayla Ünver Alçay, Kamil Bostan 1-29

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / RESEARCH ARTICLES

- **Serviks Dokularında HPV DNA Pozitifliği ve Osteopontin Düzeyi Arasındaki İlişkinin Araştırılması**
Investigation of the Relationship Between HPV DNA Positivity and Osteopontin Levels in Cervical Tissue
Esra Tuba Demir, Merve Aydın Terzioğlu, Mehmet Kulhan, Aytekin Çıkman, Barış Gülhan, Nur Gözde Kulhan, İlyas Sayar, Yusuf Kemal Arslan, Cuma Mertoğlu..... 30-38
- **COVID-19 Pandemisi Öncesi ve Sırasında Yoğun Bakım Ünitesi Hastalarından Alınan Kan Kültürü İzolatlarının Tür Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Karşılaştırılması**
A Comparison of the Species Distribution and Antibiotic Susceptibility Profiles of Blood Culture Isolates from Intensive Care Unit Patients Before and During COVID-19 Pandemic
Özlem Aytaç, Feray Ferda Şenol, Arzu Şenol, Pınar Öner, Zülal Aşçı Toraman 39-47
- **COVID-19 Hastalarının Alt Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilen Bakteriyel Etkenlerin İdentifikasyonu ve Antibakteriyel Direnç Paternlerinin İncelenmesi**
Identification of Bacterial Agents Isolated from Lower Respiratory Samples of COVID-19 Patients and Investigation of their Antibacterial Resistance Patterns
Tuğba Avan Mutlu, Taylan Bozok 48-55
- **İzmir İlinde Gebelerde Sitomegalovirüs (CMV) IgG ve IgM Antikorlarının Seroprevalansı: CMV IgG Avidite Testlerinin Analizi**
Seroprevalence of Cytomegalovirus (CMV) IgG and IgM Antibodies in Pregnant Women in Izmir: An Analysis of CMV IgG Avidity Tests
Bilal Olcay Peker, Tuba Müderris, Süreyya Gül Yurtsever, Selçuk Kaya..... 56-62
- **Kan Bankacılığında İyi Laboratuvar Uygulamalarına Temel Oluşturmak Üzere Kan Bağışçılarında Hepatit B Tarama Testleri İçin Kalite Kontrol Serumlarının Geliştirilmesi**
Development of Quality Control Sera for Hepatitis B Screening in Blood Donors for the Establishment of Good Laboratory Practices
Fahri Yüce Ayhan, Memnune Selda Erensoy, Rüçhan Sertöz 63-72
- **İntestinal Helmintlere Ait İkili ve Tekli PZR Protokollerinin Geliştirilmesi: Multipleks PZR Yolunda Bir Ön Çalışma**
Development of Dual and Single PCR Protocols for Intestinal Helminths: A Preliminary Study on Multiplex PCR
Hayriye Kirkoyun Uysal, Sinem Öktem Okullu, Elif Merve Aydın, Eray Şahin, Bahar Akgün Karapınar, Özgür Kurt 73-81

OLGU SUNUMU / CASE REPORT

- **Trakeal Aspirat Örneğinden İzole Edilen Ender Bir Etken: *Brevundimonas vesicularis***
A Rare Causative Agent Isolated from Tracheal Aspirate Sample: Brevundimonas vesicularis
Nadire Seval Gündem, Feyza Çetin, Kadir Yümlü 82-88
- YAZARLARA BİLGİ VII-VII
- ETİK POLİTİKALAR IX-X
- HAKEMLERE BİLGİ XI

Baharat ve Yenebilir Bitkilerin Probiyotik Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkileri

Antimicrobial Effects of Plants and Spices on Probiotic Bacteria

Aysun Sağlam*^{ORCID}, Nagihan Çağlar**^{ORCID}, Ayla Ünver Alçay***^{ORCID}, Kamil Bostan****^{ORCID}

* İstanbul Aydın Üniversitesi, Anadolu BİL Yüksekokulu, Gıda Kalite Kontrolü ve Analizi Programı, İstanbul, Türkiye

** İstanbul Aydın Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı, İstanbul, Türkiye

*** İstanbul Aydın Üniversitesi, Anadolu BİL Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı, İstanbul, Türkiye

**** İstanbul Aydın Üniversitesi, Güzel Sanatlar Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları, İstanbul, Türkiye

Atıf/Cite as: Sağlam A, Çağlar N, Ünver Alçay A, Bostan K. Baharat ve yenebilir bitkilerin probiyotik bakteriler üzerine antimikrobiyal etkileri. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):1-29.

öz

Günümüz insanı artık sağlık ve beslenme arasındaki ilişkiyi daha fazla irdelemekte ve sağlıklı beslenme konusunda hassasiyet göstermektedir. Bu anlamda son yıllarda öne çıkan sağlıklı beslenme unsurlarından biri de probiyotiklerdir. Yapılan bilimsel çalışmalarla probiyotiklerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri kanıtlandıktan sonra probiyotik içeren ürünler gıda pazarına sunulmaya başlanmıştır. Günümüz insanına probiyotikleri destekleyen diyetler önerilirken, gıda endüstrisinde mevcut probiyotiklerin aktivitesini ve sayısını azaltan uygulamalar da olabilmektedir. Yaygın olarak tüketilen baharat ve bazı yenebilir bitkilerin doğal olarak küçük molekül ağırlığına sahip potansiyel antimikrobiyal madde kaynağı olduğu da bilinmektedir. Günümüzde doğal gıdalara olan talebin artması ve ayrıca bazı fonksiyonel ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle gıda üretiminde bitkilerin veya ekstraktlarının kullanılması fikri oldukça revaçtadır. Ayrıca devam eden COVID 19 pandemisi ile, antimikrobiyal bitkisel ekstraktlar içeren gıda takviyelerinin ağız yoluyla bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı da inanılmaz boyutta artmıştır. Ancak bunların gıdalarda bulunan probobiyotik mikroorganizmalara karşı da antagonist etki göstermesi olasıdır. Gıdalarda bulunan faydalı mikroorganizmalara olumsuz etkisi dışında, bu bitkisel antimikrobiyal bileşenlerin kolona kadar ulaşmaları durumunda probiyotik mikroorganizmalara da bakteriyostatik veya bakterisidal olarak zarar verme olasılıkları her zaman vardır. Bu çalışmada, baharat ve bitkilerde doğal olarak bulunan antimikrobiyal bileşiklerin probiyotik bakteriler üzerine antimikrobiyal etkileri derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Doğal antimikrobiyal bileşikler, antimikrobiyal etki, probiyotik bakteriler

ABSTRACT

Today's people examine the relationship between health and nutrition more and show sensitivity about healthy nutrition. In this regard, probiotics are one of the healthy dietary ingredients that has arisen in recent years. Scientific studies have demonstrated the beneficial effects of probiotics on human health, and products containing probiotics have started to be promoted on the food market. While probiotic-rich diets are recommended for today's people, there are applications that reduce the activity and number of probiotics present in the food industry. It is also known that commonly consumed spices and some edible herbs are naturally a potential source of small molecular weight antimicrobial agents. Because of the growing demand for natural foods with some functional and antimicrobial properties, the idea of using plants or their extracts in food manufacturing is becoming increasingly popular. In addition, with the ongoing COVID 19 pandemic, the unconscious and uncontrolled oral use of food supplements containing antimicrobial herbal extracts has grown massively. These, however, may have an antagonistic impact on probiotic microorganisms present in foods. Apart from harming beneficial bacteria in foods, there is always the risk of damaging probiotic microorganisms as bacteriostatic or bactericidal agents if these herbal antimicrobial components reach the colon. In this study, antimicrobial effects of naturally occurring antimicrobial compounds in spices and herbs on probiotic bacteria were compiled.

Keywords: Natural antimicrobial compounds, antimicrobial effect, probiotic bacteria

Alındığı tarih / Received:

30.04.2021 / 30.April.2021

Kabul tarihi / Accepted:

15.09.2021 / 15.September.2021

Erken çevrimiçi / First Published:

31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

A. Sağlam 0000-0002-4833-6107

N. Çağlar 0000-0002-7700-5307

A. Ünver Alçay 0000-0003-3254-155X

K. Bostan 0000-0001-7583-0066

✉ aysunsaglam@aydin.edu.tr

GİRİŞ

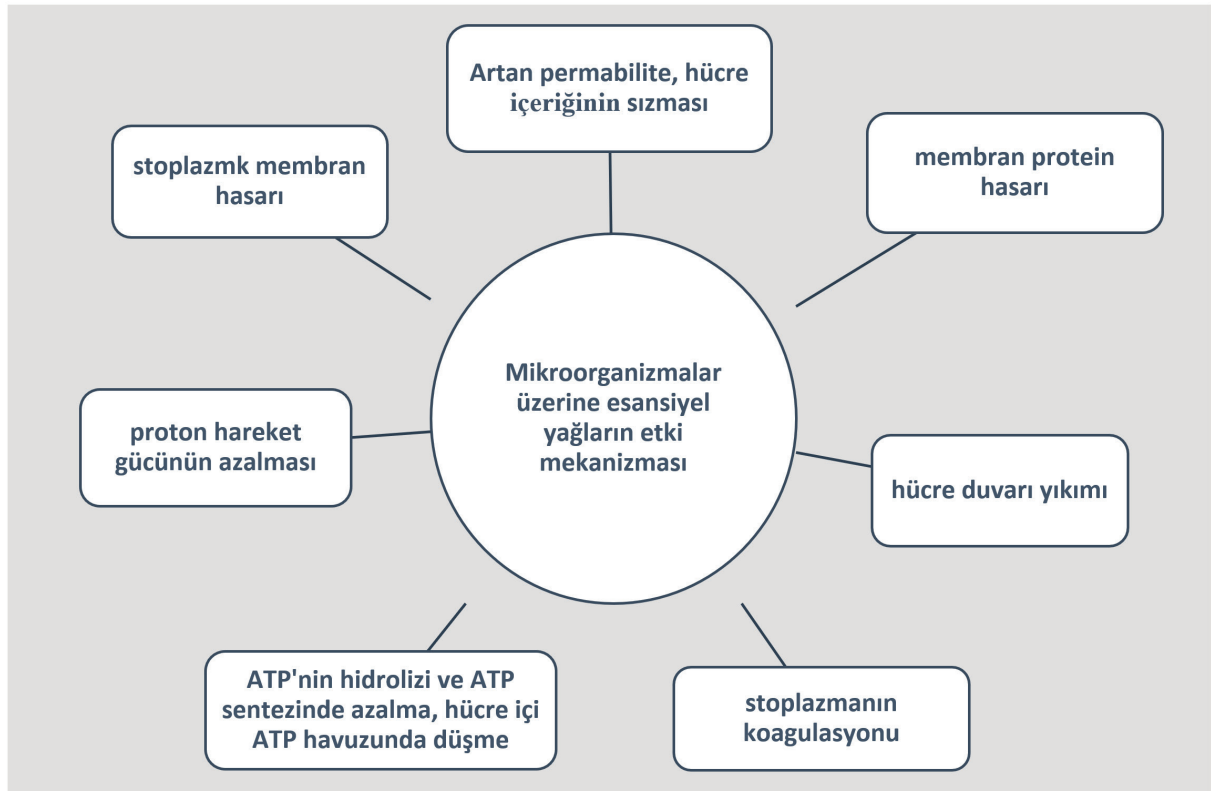
Probiyotik terimi, kökenini Yunancadan alan ve 'yaşam için' anlamına gelen bir kelimedir⁽¹⁾. Ilya Metchnikoff XX. yüzyılın başlarında probiyotik teriminden bahseden ilk kişi olarak bilinmektedir⁽²⁾. Geçmişten günümüze probiyotiklerle ilgili pek çok çalışma ve tanımlama yapılmıştır. Bütün bu çalışmaların ışığında, Havenaar ve Huis In't Veld tarafından yapılan tanım, probiyotik kavramına en yakın tanım olarak kabul edilmektedir. Buna göre probiyotikler "konakçının bir bölgesinde, mikroflorayı (implantasyon veya kolonizasyon yolu ile) değiştiren, yeterli sayıda canlı mikroorganizma içeren ve böylece bu konakçının sağlığı üzerinde faydalı etkilere sahip saf veya karışık kültür" olarak tanımlanmıştır⁽³⁾. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FDA) tarafından 2002 yılında yapılan tanıma göre ise probiyotikler, "konakçıya yeterli miktarda verildiğinde, sağlık yönünden yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır"⁽³⁾.

Probiyotik gıdalar belirli sayıda (genellikle 10⁸-10⁹ cfu/gram) canlı mikroorganizma içermelidir. Popüler olarak kullanılan probiyotik bakteriler; *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* gibi bifidobakteriler ve *Lactobacillus* cinsi bakteriler (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus salivarius*) fonksiyonel gıda çeşitlerinin üretimi için ticari olarak kullanılan probiyotik suşlardır. Ayrıca probiyotik olarak kullanılan ticari suşlar arasında *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* gibi enterekoklar da vardır. *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus salivarius* ve *Streptococcus thermophilus* gibi birkaç *Streptococcus* türü ve *Saccharomyces boulardii* de probiyotik olarak kullanılmaktadır⁽⁴⁾.

Bitkiler, bilinen ve olası sağlık yararları nedeniyle de antik çağlardan beri antioksidatif, anti-enflamatuar, antidiyabetik, antihipertansif ve antimikrobiyal aktiviteler gibi terapötik özellikleri nedeniyle geleneksel tıbbi uygulamalarda da kullanılmaktadırlar⁽⁵⁻⁷⁾. Aynı zamanda mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkileri ile gıdalarda mikrobiyal stabilizasyonunda da kullanılırlar⁽⁸⁾. Tablo 1'de antimikrobiyal aktivite içeren bazı bitkiler ve temel bileşenleri özetlenmiştir. Bitkisel ekstraktlar, su, alkol, klorofom veya hekzan gibi çözücüler kullanılarak bitkilerin taze veya kurutulmuş yapraklarının, çiçeklerinin, meyvelerinin, çekirdeklerinin veya odunsu kısımlarının belirli ekstraksiyon yöntemi elde edilen sıvı, toz ya da viskoz bitki özlerine verilen isimdir. Bitkilerde bulunan diğer bir grup antimikrobiyal de doğal uçucu sıvılar olan uçucu yağlardır. Bunlar, bitkisel kökenli doğal bir hammadde buhar damıtma yoluyla, mekanik işlemlerle veya kuru damıtma yoluyla elde edilen ürünlerdir. Esansiyel yağlarda çok sayıda farklı kimyasal bileşik bulunmaktadır ve antibakteriyel aktivitelerinin belirli bir mekanizmayla ilgili olmayıp hücrede birkaç hedef olduğu düşünülmektedir. Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili bileşiklerin yaklaşık %90-95'i monoterpenler ve seskiterpen hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri, aldehitleri, alkoller ve esterleridir. Uçucu olmayan kısmın geri kalanında hidrokarbonlar, yağ asitleri, steroller, karotenoidler, mumlar, kumarinler ve flavonoidler olarak sıralanabilir. Uçucu yağlardaki bu bakteri ve mantarlara karşı en aktif bileşenleri terpenler (örneğin, p-cymene, limonen), terpenoidler (örneğin, timol, karvakrol), fenilpropenler (örneğin, öjenol, vanilin) ve allisin gibi diğer bileşikler veya izotiyosiyanatlardır⁽⁹⁾. Uçucu yağlar için ana antimikrobiyal etki mekanizmaları Şekil 1'de sunulmuştur. Esansiyel yağların ve bileşenlerinin önemli bir özelliği, bakteriyel hücre zarı ve mitokondrilerde yapıları bozan ve onları daha geçirgen hale getiren hidrofobiklikleridir. Uçucu yağlar hücre zarındaki lipidlerle etkileşir ve lipofilik karakterlerinden dolayı sitoplazmadan kolayca geçebilirler. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısı, hidrofobik moleküllerin hücre içine girmesini kolaylaştırır. Gram pozitif bakterilerde hücre duvarının daha basit yapısı, uçucu yağların bileşikleriyle etkileşime izin verirken, Gram negatiflerde hücre

Tablo 1. Antimikrobiyal aktivite içeren bazı bitkiler (Covan, 1999)⁽¹⁰⁾

Yaygın İsim	Bilimsel Adı	Temel Bileşen	Bileşen Ana Sınıf
Karabiber	<i>Piper nigrum</i>	Piperin	Alkaloid
Yenibahar	<i>Pimenta dioica</i>	Öjenol	Esansiyel Yağ
Kırmızı biber	<i>Capsicum annuum</i>	Kapsaisin	Terpenoid
Nane	<i>Mentha piperita</i>	Mentol	Terpenoid
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	Kafeik asit	Terpenoid
Zerdeçal	<i>Curcuma longa</i>	Kurkumin	Terpenoidler
Seylan Tarçını	<i>Cinnamomum verum</i>	Uçucu yağlar, diğerleri	Terpenoidler, tanenler
Elma	<i>Malus sylvestris</i>	Floretin	Flavonoid türevi
Reyhan	<i>Ocimum basilicum</i>	Uçucu yağlar	Terpenoidler
Yeşil çay	<i>Camellia sinensis</i>	Kateşin	Flavonoid
Yaban mersini	<i>Vaccinium spp.</i>	Fruktoz	Monosakkarit
Şerbetçiotu	<i>Humulus lupulus</i>	Lupulon, humulon	Fenolik asitler
Papatya	<i>Matricaria chamomilla</i>	Antemik asit -	Fenolik asit Kumarinler
Dereotu	<i>Anethum graveolenleri</i>	Esansiyel yağ	Terpenoid
Okaliptüs	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tanen	Polifenol
Bakla	<i>Vicia faba</i>	Fabatin	Tionin
Sarımsak	<i>Allium sativum</i>	Allisin, Ajoene	Sülfoksit, Sülfatlanmış terpenoidler
Soğan	<i>Allium cepa</i>	Alisin	Sülfoksit
Meyan Kökü	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glabrol	Fenolik Asit
Zeytinyağı	<i>Olea europaea</i>	Heksanal	Aldehit



Şekil 1. Esansiyel yağların antimikrobiyal etki mekanizması (Khorshidiana ve ark., 2018)⁽¹²⁾

zarının yapısı, uçucu yağların daha zor geçtiği bir bariyer gibidir⁽¹⁰⁻¹²⁾. İyonların sızıntısı ve diğer hücre içerikleri daha sonra meydana gelebilir ve bakteri hücrenin ölümüne neden olur. Esansiyel yağların etki mekanizmaları, hücre duvarının bozulmasını, sitoplazmik membrana zarar vermesini, sitoplazmik pıhtılaşmayı, zar proteinlerine zarar vermesini, hücre içeriğinin sızmasına yol açan geçirgenliğin artmasını, proton hareket kuvvetinin azaltılmasını, hücre içi ATP'nin (Adenozin üç fosfat) havuzunun azaltılmasını içerir. Tablo 2'de bitkilerde tespit edilen başlıca antimikrobiyal bileşik sınıfları ve etki mekanizmaları görülmektedir. Küçük hidrofilik moleküller Gram negative bakterilerinin porin proteinlerinden geçebilir. Porinler hidrofobik moleküllere nispeten dirençlidir, ancak tamamen dirençli olmadığı için bazı esansiyel yağlar (örneğin fesleğen, adaçayı veya kekik) Gram negatifler üzerinde de etkilidirler^(9,13).

Günümüzde sağlıklı beslenme, doğal gıdalara yönelim ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle,

bitkilerin, ekstraktlarının veya uçucu yağlarının gıdalara eklenmesi büyük ilgi çekmektedir. Yaygın olarak tüketilen baharat ve bazı yenilebilir bitkilerin veya ekstraktlarının patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı antagonistik etkileri hakkında yapılmış çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bitkilerin ve bunların özlerinin/özütlerinin gıda takviyesi olarak günlük düzenli tüketilmesi ve doğal gıda katkı maddesi olarak kullanıma potansiyeli nedeniyle probiyotik bakteriler gibi arzu edilen, yararlı bağırsak bakterilerine karşı nasıl bir etkiye sahip olduğu ve probiyotik gıdalarda bulunan faydalı mikroorganizmaları nasıl etkileyeceği önemli bir soru işareti olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, bitki ve baharat tüketiminin probiyotik bakteriler üzerine etkisinin tartışılması gereklidir. Bu derlemede, baharat ve bitkilerde bulunan antimikrobiyal bileşikler, etki mekanizmaları ve probiyotik bakteriler üzerine antimikrobiyal etkileri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Tablo 2. Bitkilerden elde edilen başlıca antimikrobiyal bileşik sınıfları (Cowan, 1999)⁽¹⁴⁾

Sınıf	Alt Sınıf	Örnekler	Mekanizma
Fenolikler (Phenolics)	Basit fenoller	Katekol	-substrat yoksunluğu
		Epikateşin	-membran bozulması
	Fenolik asitler	Sinamik Asit	-tanımlanamadı
	Kinonlar	Hiperisin	-hücre duvarı ile kompleks olan adezinlere bağlanır, enzimleri inaktive eder
	Flavonoidler	Krizin (Chrysin)	-adhezine bağlanma
	Flavonlar	Habeşon (Abyssinone)	-hücre duvarı ile kompleks enzimleri inaktivasyonu, HIV reverse-transkriptazı inhibisyonu
	Flavonoller	Totarol	-tanımlanamadı
	Tanenler	Ellagitannin	-proteinlere bağlanma, adhezine bağlanma, enzim inhibisyonu, substrat yoksunluğu, hücre duvarı ile kompleks, membran bozulması, metal iyon kompleksi
Terpenoidler, uçucu yağlar	Kumarinler	Varfarin	-ökaryotik DNA ile etkileşim (antiviral aktivite)
		Kapsaisin	-membran bozulması
Alkaloidler		Berberin Piperin	-hücre duvarına ve/veya DNA'ya interkalasyon
Lektinler ve polipeptitler		Mannoza özgü agglutinin (Mannose-specific agglutinin) Fabatin	-viral füzyonu veya adsorpsiyonu bloke eder -disülfür köprüleri oluşturur
Poliasetilenler		8S-Heptadeca-2(Z), 9(Z)-dien-4,6-diyne-1,8-diol	-

Baharat Olarak Kullanılan Bazı Bitkiler

Karabiber (*Piper nigrum* Linn.)

Karabiber, *Piperaceae* familyasından çiçekli, çok yıllık, tırmanıcı bir bitkinin meyve kısımlarının tam olgunlaşmadan toplanması ve kurutulmasıyla tane olarak elde edilen, Dünyanın geçmişi en eskiye dayanan ve en önemli baharatlarından biridir⁽¹⁴⁾. Türkiye’de genellikle tercih edilen baharatlar; karabiber, kimyon, kekik, tarçın, karanfil, zencefil, yenibahar, nane, kırmızıbiber ve anason olarak belirtilmektedir⁽¹⁵⁾. Bölgesel olarak yapılan birçok anket çalışmasında karabiberin aileler ve kadınlar tarafından en çok tercih edilen baharat olduğu da tespit edilmiştir^(15,16).

Piper cinsi, *Piperaceae* ailesinden bulunan 2000’den fazla türde bitkinin geniş biyoaktivite (antifungal, antibakteriyel, pestisidal) spektrumları bilinmektedir. Bugüne kadar, bu cinsten yaklaşık 400 yapısal ve biyolojik olarak farklı bileşik izole edilmiştir. Bunların çoğu alkaloidler, lignanlar, flavonlar, kalkonlar, fenilpropanoidler ve kava-pironlardır. Piper türlerinden çeşitli amid alkaloidleri, izobütül, piperidin, dihidropiridin, piperidin ve benzilamin kısımları, bazı aristolaktamlar ve dimerik amidler belirlenmiştir. Bu alkaloidlerin insektisid, antibakteriyel ve antidepresif etkileri bilinmektedir. İzopentilamidlerin, bazı Gram-pozitif bakteriler ve bazı Gram-negatif bakteriler üzerinde inhibisyonun gösterdiği agar kuyu difüzyon testi ile gösterilmiştir⁽¹⁷⁾. Karabiberde var olan başlıca monoterpen hidrokarbonlar α -pinen, β -pinen, sabinen ve limonendir⁽¹⁸⁾. Bunların dışında, klorofil ve diğer renklendirici maddeler, reçineler, şekerler, sabit yağlar vb.’de bulunmaktadır⁽¹⁹⁾. *P. nigrum*’un çok sayıda piperidin ve piperidin alkaloidleri içerdiği bilinmektedir. Karabiberin tadı, tohumlarında biriken keskin biyoaktif alkaloidler olan piperamidlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bunlar arasında piperin, karabiberin acı tadından sorumlu olan ve karabibere karakteristik tadı veren en önemli maddedir. Karabiberin aneljezik, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri bulunmakta, bu özelliklerin içerisinde bulunan piperinden kaynaklandığı düşünülmektedir⁽²⁰⁾.

Karabiberin gıdalarla ilişkili patojen bakteriler üzerine gösterdiği antimikrobiyal etki ile alakalı pek çok çalışma bulunmaktadır⁽²¹⁻²³⁾. Shete ve ark.⁽²⁴⁾ sekiz adet Hindistan baharatından [kimyon tohumu (*Cuminum cyminum*), yıldız anason (*Illicium verum*), kakule (*Elettaria cardamomum*), malabatathrum (*Cinnamomum tamala*), karanfil (*Syzygium aromaticum*), karabiber (*P. nigrum*), tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) ve Dagadphool (*Foliose liken*)] elde ettikleri farklı ekstraktların (sulu, etanollu, metanollu) çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkisini agar kuyu difüzyon ile incelemiştir. Karabiber ve yıldız anasonunun alkollü ekstraktlarının Gram negatif bakterilere karşı, yine karabiber ve karanfilin Gram pozitif bakterilere karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir.

Reddy ve ark.⁽¹⁷⁾, *P. nigrum*’un petrol eter ekstraktından elde ettikleri beş farklı bileşiğin (1.2E, 4E, 8Z-N-izobütülikosatrienamid, 2.pellitorin, 3.trakyon, 4.pergumidien ve 5.izopiperolein B) *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella aerogenes* ve *Chromobacterium violaceum* bakterileri üzerine güçlü antimikrobiyal aktivitesi olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada *in vitro* minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerleri, 20-70 mM olarak saptanmıştır. Zou ve ark.⁽²⁵⁾’nın karabiber kloroform ekstraktının antibakteriyel mekanizması aydınlatmak amacıyla yaptığı çalışmada, ekstraktın *Escherichia coli* ve *S. aureus* morfolojisi üzerindeki etkisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görselleştirilmiş, bakteri hücrelerinin yok edildiği ve plazmolizin indüklendiğini gözlemlenmiştir. Söz konusu ekstrakttaki antibakteriyel bileşenlerin, bakterilerin trikarboksilik asit yolunu inhibe ettiği ve hücresel solunumu kısıtladığı, bakteri çözeltilerinde piruvik asit konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve bakteri hücrelerinde ATP seviyesini azalttığı belirlenmiştir. Ekstrakt, hücre zarının geçirgenliğini bozarak metabolik işlev bozukluğuna neden olmuş, enerji sentezini inhibe etmiş ve hücre ölümünü tetiklemiştir.

Zhang ve ark.⁽²⁶⁾, ticari olarak satın alınmış karabiber esansiyel yağının (KBEY) *E. coli* üzerindeki antibakteriyel aktivitesini araştırmak ve potansiyel etki mekanizmasını değerlendirme amaçlı yaptıkları araştırmada, MIK değerini 1.0 µL/mL, inhibisyon zon çapını 17.12 ile 26.13 mm olarak tesbit etmişlerdir. KBEY ile muamele edilmiş *E. coli*'nin morfolojik değişikliklerini belirlemek için SEM kullanılmıştır. KBEY muamelesi, *E. coli*'nin hücre duvarında ve zarında fiziksel ve morfolojik değişikliklere neden olmuştur. KBEY *E. coli*'ye karşı etki mekanizması, önce esansiyel yağın hücre zarının geçirgenliğini aşip ardından elektrolitlerin, ATP'nin, proteinlerin ve DNA materyallerinin sızmasına neden olması şeklinde açıklanmıştır. Ancak Esansiyel yağların heterojen bileşimleri nedeniyle, yalnızca bir etki mekanizması olması veya antimikrobiyal etkiden yalnızca bir bileşenin sorumlu olmasının ihtimal dahilinde olmadığı, bu nedenle, mekanizmaları tam olarak anlamak için hala daha fazla araştırma gerekli olduğu vurgulanmıştır.

Karsha ve Lakshmi⁽²²⁾, araştırmalarında *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, ve *E. coli* referans suşları kullanarak karabiberin aseton ve diklorometan (DKM) ekstraktlarını disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite açısından değerlendirilmiştir ve Gram pozitif bakteriler Gram negatiflerden daha duyarlı bulunmuştur. Aseton ekstraktı (5 µl)'nin incelenen Gram pozitif bakteriler için zon inhibisyon çapları 18-20 mm, Gram negatifler için 10-15 mm; DKM ekstraktının (5 µl) Gram pozitifler için 12-15 mm, Gram negatifler için 0-14 mm olarak belirlenmiştir. MIK, tüp seyreltme yöntemi ile belirlenmiştir ve 50-500 ppm aralığında bulunmuştur. Aseton ekstraktı gram pozitifler üzerinde mükemmel inhibisyon göstermiştir. Aseton ekstraktının *S. aureus*, *B. cereus* ve *S. faecalis* için MIK değerleri sırasıyla 125, 250 ve 500 ppm, DKM ekstraktının 12.5, 62.5 ve 125 ppm olarak belirlenmiştir. Aseton ekstraktının *P. aeruginosa*, *E.coli*, *K. pneumoniae* ve *Salmonella typhi* için MIK değerleri sırasıyla 62.5, 125, 125, 250 ppm ve DKM ekstraktının 125, 125,125, 250 ppm olarak saptanmıştır. DKM ekstraktı hem Gram pozitifler ve hem de Gram negatifleri inhibe etmiş ve iyi aktivite göstermiştir.

Ülkemizde tüketimi yaygın olan karabiberin, probiyotiklere karşı antimikrobiyal etkisi ile alakalı çok az çalışma vardır. Karabiberde antimikrobiyal etki gösteren ana bileşiklerden olan monoterpenler gibi uçucu yağların çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile eldesinde daha çok hekzan, etanol, eter gibi solventler tercih edilmektedir⁽²⁷⁾. Sutherland ve ark.⁽²⁸⁾, araştırmalarında organik ve sulu çözücüler, ve hem nötr hem de asidik koşullar kullanılarak hazırlanan farklı ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerini, bazı bakteriler üzerinde incelemiştir. Bu çalışmada, içerisinde karabiberin de bulunduğu 37 adet gıdadan elde edilen 148 adet ekstraktın belirli probiyotik (*L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacteria lactis*) ve patojen bakterilere karşı etkisi minimum inhibitör konsantrasyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Karabiberin hazırlanan sulu ekstraktlarının en yüksek iki konsantrasyonu (1:50 ve 1:500) *L. reuteri*'nin gelişimini artırırken, diğer iki probiyotik bakteri (*B. lactis* ve *L. rhamnosus*) üzerinde kayda değer bir etkisi olmadığını saptamıştır. Ayrıca doza bağlı olarak *E. coli* 0157 and *E. coli* LF82 üremesini inhibe etmiştir. Organik çözücü (etil asetat) ile elde edilen ekstraktın ise bütün probiyotik bakteriler üzerinde inhibe edice etkisi olduğunu bildirmiştir. Çalışmada elde edilen antimikrobiyal etki farklarının çözücüye bağlı olduğu ve antimikrobiyal etkili monoterpenlerin etil asetat ile ekstrakta daha çok geçtiği düşünülmektedir.

Karanfil (*Syzygium aromaticum* L)

Karanfil, 10-20 metre boyunda, mızrak yapraklı, salkım şeklinde sarı çiçekli, yeşil, *Myrtaceae* familyasına ait Endonezya kökenli bir bitkiden elde edilen bir baharattır⁽²⁹⁾. Ülkemizde genellikle bitki çaylarında, bazı soslarda, unlu ve şekerli mamullerde, parfüm ve ilaçlarda kullanılan karanfil Türkiye'de en çok tercih edilen baharatlardan biridir⁽¹⁵⁾. İçerisinde %15-20 arasında uçucu yağ içermektedir. Lezzetini ve tipik kokusunu antimikrobiyal ve analjezik bir madde olan öjenol (2 metoksi-4-allil fenol, eugenol) vermektedir. Ajiboye ve ark.⁽³⁰⁾'nın, gerçekleştirdiği çalışmada, karanfil tohumlarının sulu ekstraktının GC-MS analizi ile öjenol asetat, β-karofillen , ögenin, öjenol, metil salisilat, β-humulen, rhamnetin, farnesol,

α -copeane, β -ylangene, kaempferol, sinamik asit, oleanolik asit, benzilaldehit, oleanolik asi, α -cubene, karvikol, benzoik asit içerdği belirlenmiş ve *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite mekanizması araştırılmıştır. Bu çalışmada, MİK ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri sırasıyla 0.06 ve 0.10 mg/mL olarak saptanmıştır. Bu araştırmada oksidatif stresin ve membran geçirgenliği artışının, sulu ekstraktların olası antibakteriyel aktivite modu olduğu belirlenmiştir. Karanfil, mikroorganizmaların hücre duvarlarını ve zarlarını tahrip edebildiği ve sitoplazmik zarlara nüfuz ederek hücrelere girebildiği, normal DNA ve protein sentezini inhibe edebildiği ve ayrıca karanfilin ana bileşeni olan öjenolün, *B. cereus*'un amilaz ve proteaz üretimini engelleyebildiği ve hücre duvarını bozma ve hücre parçalama yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir⁽³¹⁾.

Friedman ve ark.⁽³²⁾'nın, 96 uçucu yağ ve 23 yağ bileşiminin bakterisidal aktivitelerini *in vitro* olarak inceledikleri araştırmada sinmalaldehit, timol, karvakrol ve öjenolün, *E. coli*, *Salmonella enterica* ve *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı en aktif bileşenler olduğu tespit edilmiştir. Moritz ve ark.⁽³³⁾'nın araştırmalarında, süte artan konsantrasyonlarda, buhar distilasyonu ile elde edilmiş tarçın, karanfil ve nane esansiyel yağları eklenerek *L. rhamnosus* ve yoğurt starter kültürü (*S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) ile fermentasyonu yapılmış ve bu bakteriler üzerinde duyarlılığı değerlendirilmiştir. Üç esansiyel yağ için çeşitli kombinasyonlarda starter kültür ve *L. rhamnosus*'u kullanarak yoğurt üretimi gerçekleştirmişlerdir. MİK değerleri, farklı konsantrasyonlarda (0.025-2.00) (%v/v) esansiyel yağların eklenmesi sonucunda rezazurin kullanarak mikrobiyal gelişme görülmeyen ilk konsantrasyon olarak belirlemişlerdir. Karanfil, nane ve tarçından elde edilen esansiyel yağların sırasıyla yoğurt starter kültürü için MİK değerleri; 0.2, 0.4, \leq 0.025% (v/v) olarak saptanmıştır. Tarçın esansiyel yağının özellikle starter kültüre karşı en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Eklenerek olan esansiyel yağ konsantrasyonu duyuşal analiz sonuçları dikkate alınarak 0.04% (v/v) olarak belirlenmiştir. Tarçın esansiyel yağ konsantrasyonu arttıkça panelistler tarafından yoğurdun kabulü

azalmıştır. Karanfil ve nane esansiyel yağları ile *L. rhamnosus* ve yoğurt starter kültürü üzerinde yalnızca öldürücü olmayan bir etki gözlemlenmiştir ve bu sonucun bunların kullanımının üretimde fermentasyon sürecini bozmayacağı anlamına geldiği ifade edilmiştir. Tarçın esansiyel yağı ilavesi, starter kültür sayımı üzerinde önemli bir etki göstermiş ve daha düşük laktik asit üretimine yol açmıştır. Ancak karanfil ve nane esansiyel yağlarına benzer şekilde, *L. rhamnosus*'u önemli ölçüde etkilememiştir. Bu sonuçlara göre tarçın esansiyel yağının yoğurtta kullanılması starter kültür fermentasyonunu engellese de *L. rhamnosus*'un probiyotik olarak eklenmesinde sorun olmayacağı belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, Si ve ark.⁽³⁴⁾, toplam 66 adet esansiyel ve yapısal olarak benzer sentetik gıda katkısının belirli patojenlere (*E. coli* O157:H7, *E. coli* K88, *Salmonella typhimurium* DT104) ve yararlı bağırsak bakterilerine (*L. plantarum* 98L11, *L. plantarum* 62E11a, 62E21, *L. acidophilus* FRP728, *B. longum* FRP63, *B. breve* FRP67) karşı antimikrobiyal aktivitesi, *in vitro* bakteri üremesinin inhibisyonunun belirlenmesiyle incelemiştir. *E. coli* K88, *E. coli* O157:H7 ve *S. typhimurium* DT104 için karanfil yağının minimum bakterisid konsantrasyonu (MBK), sırasıyla 233 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 283 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$; tarçın yağı için 133 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 133 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; öjenol (euganol) için 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 466 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Dokuz esansiyel yağın/bileşimin antimikrobiyal aktivitesi, anaerobik kültür koşulları altında Bioscreen C sistemi (Labsystem) ile ölçülerek daha ayrıntılı incelenmiştir. Öjenolün yararlı bağırsak bakterilerine karşı düşük oranda etkili olduğu saptanmıştır. Genel olarak aerobik koşullar altında, incelenen *L. plantarum* suşlarının, *L. acidophilus*'dan daha toleranslı olduğu, anaerobik koşullarda ise bifidobakterilerin patojenlerden daha az duyarlı olduğu belirlenmiştir. Domuz bağırsağı sindiriminin seçilen uçucu yağların/bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için, 6 haftalık beş sağlıklı domuzdan alınan çekal sindirim birleştirilmiş ve daha sonra hemen antimikrobiyal analizler için kullanılmıştır. Bu aşamada, *E. coli*/koliform, laktobasil ve anaerobik bakterilere ve eklenen *E. coli* O157:H7'ye karşı inhibisyon incelenmiştir. Yağlar/bileşikler, çekum

sindirimde *E. coli* ve koliform bakterilerini önemli ölçüde inhibe ettiği, ancak toplam laktobasil ve anaerobik bakteri sayısı üzerinde çok az etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu veriler uçucu yağların/bileşiklerin spesifik olarak Gram-negatif bakterileri hedef aldığı ve test edilen uçucu yağların ve yapısal olarak benzeyen sentetik gıda katkı maddelerinin domuz bağırsak yolunda insan ve hayvan bakteriyel patojenlerini azaltmada iyi bir potansiyel etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Kekik (*Thymus vulgaris* L. ve *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Letsw.)

Daha çok Akdeniz bölgesinde bulunan fakat dünyanın birçok bölgesinde yetişen kekik, *Lamiaceae* familyasına ait aromatik ve tıbbi bir bitkidir⁽³⁵⁾. Bir çok *Thymus* ve *Origanum* türü, Türkiye’de zengin bir floraya sahip olan kekik olarak bilinmekte⁽³⁶⁾, yemeklere lezzet ve koku vermek için başta dünya mutfakları olmak üzere Türk mutfaklarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde ise 40’a yakın yabani kekik türü yetiştirilmekte, bazı türleri geleneksel ürünlerin yapımında kullanılırken (örneğin Van çevresinde otlu peynir yapımında) daha çok et, çorba ve soslarda kullanımı görülmektedir^(37,38). Kekik farklı oranlarda timol (%12–61), karvakrol (%0.4–20.6), 1,8-sineol (%0.2–14.2), qçymene (%9.1–22.2), linalool (%2.2–4.8), borneol (%0.6–7.5), α -pinen (0.9–6.6%) gibi uçucu yağlar içermektedir⁽³⁹⁾.

Kekik uçucu yağları, antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, analjezik, antipiretik ve bağışıklık uyarıcı etkiler gibi bazı biyolojik aktivitelere sahiptir. Timol veya karvakrolün antimikrobiyal etkileri rapor edilmiştir. Kekik ana aktif bileşiği, antimikrobiyal etkisini hidrofobik bağ ve hidrojen bağı ile membran proteinlerine bağlanarak ve membranların geçirgenliğini değiştirerek gerçekleştiren timoldür. Timolün ayrıca *E. coli*’nin hücre içi adenozin trifosfat (ATP) içeriğini azalttığı ve hücre dışı ATP’yi artırdığı, bu şekilde plazma membranlarının işlevini bozabileceği bildirilmiştir Timolün Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı farklı etki gösterdiği kanıtlandığından, antimikrobiyal etkisinin kesin mekanizmalarının daha fazla araştırılması gereklidir⁽³¹⁾. Kekik ana bileşenlerinden biri

olan karvakrol, küçük katyonların geçirgenliğini değiştirerek hücre zarları ile etkileşime girebilir⁽⁴⁰⁾. Daha yüksek miktarda karvakrol içeren uçucu yağ, daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Karvakrolün, membran fonksiyonlarına müdahale ettiği, lipid membran geçirgenliğini ve hücre adenozin trifosfatı arttırdığı ve sonuç olarak hücrede ölüme neden olduğu ve *Candida albicans* suşlarının mantar zarlarındaki sterollere bağlanabileceği bildirilmiştir⁽⁴¹⁾, ancak diğer mikroorganizmalar üzerindeki tam etki mekanizmasını anlamak amacıyla daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Kekik her bir bileşenin rolünü ve bunların antimikrobiyal etkilerini tek tek belirlemesinin imkansız yakın olduğu, her bir bileşenin antimikrobiyal aktivitedeki rolünün belirlenmesi ve bu etkileşimlerin ortaya konması için uygun yazılımlara ihtiyaç duyulacağı ifade edilmiştir⁽⁴²⁾.

Farklı kekik türlerinin bir çok patojen bakteriye karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir^(43,44). Özkan ve Sağdıç⁽⁴⁵⁾, içerisinde kekik de bulunduğu çeşitli baharat (rezene, kimyon, adaçayı, defne, nane, mercanköşk, kekik otu, salamura otu, geyik out (savory), kekik, siyah kekik) uçucu yağlarının 17 farklı bakteri (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens*) üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini kağıt disk difüzyon yöntemi ile incelemiştir. Bu araştırmada, tüm incelenen esansiyel yağların en az bir veya daha fazla bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiş ve en aktif uçucu yağların mercanköşk, kekik ve kekik otu olduğu bildirilmiştir.

Roldán ve ark.⁽⁴⁶⁾ ise Kolombiya Andes’te yetişen içlerinde kekik de (*T. vulgaris*) bulunduğu altı farklı bitki türünden elde edilen esansiyel yağların patojen ve probiyotik bakterilere (*E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *L. acidophilus* ve *B. breve*) karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. *T. vulgaris*’in patojen ve probiyotiklere karşı aynı MBK (minimum bakteriyosidal konsantrasyon) değerine

(MBK \leq 5 mg/mL) sahip olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, timolün patojen bakterilere karşı inhibisyon yüzdesinin yararlı bakterilerden daha yüksek olduğu, fakat öjenol ve tarçın yağı ile karşılaştırıldığında yararlı bağırsak bakterilerine karşı daha yüksek bir inhibisyon düzeyi gösterdiği bildirilmiştir. *L. acidophilus* FRP728'e karşı inhibisyon seviyesi %88 olarak belirlenmiştir⁽³⁴⁾.

Çetin ve ark.⁽³⁶⁾, Türkiye'de endemik kekik türlerinden elde edilen uçucu yağların bazı probiyotik mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerini, *in vitro* olarak incelemiştir. Üç kekik türü (*Origanum acutidens*, *Origanum rotundifolium*, *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*) ve altı probiyotik bakteri (*Bifidobacterium bifidum*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. reuteri* ve *S. thermophilus*) test edilmiştir. Uçucu yağların antimikrobiyal etkilerini belirlemek için disk difüzyon ve mikrodilüsyon analiz yöntemleri kullanılmıştır. Disk difüzyon zon çapları ve örneklerin MIK değerleri sırasıyla 16-48 mm ve 7.80-500 μ g / mL olarak bulunmuştur. Uçucu yağlara karşı en duyarlı suşlar *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* olarak saptanmıştır. *L. acidophilus* ve *L. reuteri* diğer suşlara göre daha dirençli bulunmuştur. Karvakrol, GC-MS analizleri ile ana bileşen olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda kekik kullanımının bağırsak mikroflorasını ve özellikle fermente gıdaların kalitesini olumsuz etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Kırmızıbiber (*Capsicum annuum* L.)

Kırmızıbiber, patlıcangiller (*Solanaceae*) ailesinden 50-200 cm kadar uzayabilen, başlangıçta otsu halde olup zamanla odunsu bir hal alan, uzun, oval, yuvarlak, kenarları düz veya dalgalı, parlak veya tüylü yaprak tiplerine sahip bir bitkinin (*Capsicum annuum* L.) meyvelerinin kurutulmuş öğütülerek ya da toz halinde kullanıldığı bir çeşit baharıttır⁽⁴⁷⁾. Ülkemizde en çok tüketilen baharıtlardan biridir. Türkiye'de yaygın olarak üretilmekte ve dış satımı yapılmaktadır⁽⁴⁸⁾. Biber meyvesi, provitamin A, E ve C vitaminleri; karotenoidler ve kapsaisinoidler, luteolin ve kuersetin gibi fenolik bileşiklerin iyi bir kaynağıdır. *Capsicum* meyvelerinden elde edilen acı biberlerde bulunan kapsaisinoidler acı tattan sorumludur.

Kapsaisin ve dihidrokapsaisinden başka biberlerde en az dokuz önemsiz kapsaisinoidin bulunduğu belirlenmiştir. Meyveler olgunlaştıkça kapsaisinoidler artar. Kapsaisin ve diğer kapsaisinoidler, stabil alkaloidlerdir; uzun süre pişirilip çözüldükten sonra da bozulmadan kalırlar⁽⁴⁹⁾. *C. annuum* L., antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antienflamatuar ve antikanser dahil olmak üzere birçok temel besin ve biyoaktif bileşik içerir.

Kırmızı biberde, alkaloidler, flavonoidler, polifenoller ve steroller biyolojik aktif bileşikler olarak tanımlanmıştır. Fitokimyasallar, farklı mekanizmalar yoluyla antimikrobiyal aktivite gösterirler. Alkaloidler tüm *Capsicum* biber ekstraktlarında bulunmaktadır. *C. annuum* ekstraktlarında bulunan diğer bir bileşen olan flavonoidlerin, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, anti-anjiyonik, analjezik, anti-alerjik etkiler, sitostatik ve antioksidan özellikleri bilinmektedir. *C. annuum* meyvelerinin antimikrobiyal aktivitesinden, temel olarak kapsaisin veya diğer sinnamik asit yolu ara ürünlerinin sorumlu olduğu ileri sürülmektedir⁽⁵⁰⁾. İki *C. annuum* L. türünden (kıvrıkcık kırmızı ve büyük kırmızı biber) oleoresin etanol ile ekstrakte edilmiş ve ardından patojenik bakterilere (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermis* ve *E. coli*, *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivitesi *in vitro* disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Kıvrıkcık kırmızı biber oleoresinin *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* için inhibisyon bölgesinin sırasıyla 18.25, 17, 24 ve 2.9 mm olduğu, aynı şekilde büyük kırmızı biber oleoresinin inhibisyon zonunun sırasıyla 2.86, 2.02, 1.06 ve 1.65 mm olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *C. annuum* L. oleoresinin, potansiyel bir doğal antibakteriyel ürün olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir⁽⁵¹⁾.

Casimir ve ark.⁽⁵²⁾, biber meyvesinin (*C. annuum* var an.) ham ve konsantre ekstraktlarında antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip kimyasal bileşim, toplam flavonoid ve karotenoid içeriğini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, konsantre ekstrakt, ters ozmoz işlemi ile elde edilmiş ve radikal süpürme potansiyeli belirlenmiştir. *C. annuum*'un konsantre ekstraktlarının GC-MS analizi ile *C. annuum* ekstraktlarının laktik asit, valerik asit, 5-metoksi, bütandioik asit, fenilalanin, heksadekanik asit, etil ester, 6-metoksi-heksan-

2-ol, bütan, 2,3 diol, pentanoik asit, 4-okso-, 3-metil- 2-hidroksilbutanoik asit, benzenasetik asit, 4-hidroksil, 1,2-benzendikarboksilik asit ester, 2,5-furandikarboksilik asit, 7-hidroksil-7-metiloktanoik asit ana bileşenleri içerdiğini göstermiştir. Sonuçlar, konsantre ekstrakttaki toplam flavonoid ($3.7 \pm 0.1 \text{ g/L}$ Eş kuersetin) ve toplam karotenoid ($54.33 \pm 1.1 \text{ mg/100 mL}$ taze ekstrakt) içeriğinin ve antioksidan aktivitelerinin (83.44 ± 0.98) olduğunu göstermiştir. Çalışma ayrıca Gram pozitif ve negatif mikroorganizmaların test edilen konsantre ekstraktan etkilendiğini göstermiştir ve ekstraktının MİK değerlerinin 10 ile 20 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğunu göstermiştir. Kullanılan mikrobiyal suşlar Gram pozitif bakteriler (*S. aureus* UFPEDA02, *E. faecalis* ATCC6057 ve *B. subtilis* UFPEDA86) ve Gram negatif bakterilerden (*E. coli* ATCC25922, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* UFPEDA416) seçilmiştir.

Oranisu ve ark.⁽⁵³⁾, Nijerya'da bazı baharatların (kimyon, köri, kırmızı biber, beyaz biber ve zencefil) metanol ekstraktlarının, standart agar kuyu difüzyon ve tüp dilüsyon (MİK) yöntemleri ile bazı mikroorganizmalar (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. typhi* and *Proteus mirabilis*) üzerine antibakteriyel aktivitelerini araştırdıkları çalışmada, 6.25 ile 25.0 mg/ml arasında değişen MİK tesbit edilmiştir. Kırmızı biberin tüm test organizmaları üzerinde geniş antimikrobiyal etki (25.0 ve 12.5 mg/ml) gösterdiği belirlenmiştir.

Sutherland ve ark.⁽²⁸⁾'nin çalışmasında ekstraktların hem probiyotik (*L. reuteri*, *L. rhamnosus* ve *B. lactis*) hem de patojenler (*E. coli* O157 ve *E. coli* LF82) üzerine antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiş, kırmızı biberin sulu ekstraktlarının 5 g kuru ağırlığın 1:50 konsantrasyonunda, test edilen tüm bakteriler üzerinde geliştirici etkisi olduğunu, etil asetat ile hazırlanan ekstraktların ise incelenen tüm bakteriler üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu saptamışlardır. Ekstraktların kimyasal analizi yapılmamıştır. Ancak, antimikrobiyal etkili maddelerin etil asetat ile hazırlanan ekstrakta geçtiği ve antimikrobiyal etkide kullanılan çözücünün de önemli olduğu düşünülmektedir.

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), mikroorganizmalar, eklem bacaklılar, bitkiler ve hayvanlar dahil hemen hemen tüm canlılarda doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasını oluşturur. Bu AMP'ler, patojenik bakterilere (Gram-negatif ve Gram-pozitif), mantarlara, zarflı virüslere ve diğer parazitlere karşı güçlü, geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileri vardır. Bitkiler, kendilerini patojenlere karşı savunmak için çok çeşitli antimikrobiyal proteinler ve peptitler üretirler ve hemen hemen tüm bitki türlerinde genellikle tohumlar, yumrular, üreme organları, çiçekler ve meyveler gibi depolama organlarında bulunurlar. Bu peptitlerin, bitkilerin mikrobiyal enfeksiyona karşı korunmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar, 3 ile 10 kDa arasında değişebilen düşük moleküler ağırlığa ve pozitif yüke sahiptirler, hidrofobik bir yüzeye ve başka bir yüklü yüzeye sahip amfipatik moleküllere katlanırlar ve hedef hücrenin zarı ile etkileşimi kolaylaştırırlar. Birincil yapıların homolojisine dayanarak, bitki antimikrobiyal peptidleri snakinler, hevein tipi peptitler, düğüm tipi peptitler, MBP-1 peptitler, makrosiklik peptitler, lipid transfer proteinleri (LTP'ler), defensinler ve tiyoninler olmak üzere gruplandırılabilir. *Capsicum* bitkilerinin farklı kısımlarından, AMP'ler tanımlanmıştır. *C. annum* L. tohumlarından izole edilen peptitler, maya üremesine karşı etkilidir ve *C. annum* meyvelerinde mantar önleyici ve antibakteriyel tiyonin de tanımlanmıştır. Moleküler kütleleri 5.0 ile 8.5 kDa arasında olan, farklı mayalara karşı güçlü antifungal aktiviteye sahip ve serin-proteinaz inhibitörlerine yüksek oranda homolog olan üç peptit saptanmıştır⁽⁵⁴⁾. Etkili bitki kaynaklı antifungal bileşiklerin ticari potansiyeli büyük ölçüde keşfedilmemiştir. Bitkilerde bulunan yeni AMP'lerin insanlar üzerinde olası kullanımı için daha fazla araştırılmasına ihtiyaç vardır. Bu tür yaklaşımların, insan enfeksiyonlarını tedavi etmek için bitki peptitlerinin üretimi konusunda yeni ufuklar açacağı düşünülmektedir^(55,56).

Kimyon (*Cuminum cyminum*)

Kimyon anavatanı Doğu Akdeniz ve Orta Doğu olan, Mayıs-haziran ayları arasında beyaz ve pembemsi renkli çiçekleri açan, maydanozgiller (*Apiaceae*)

familyasına ait bir yıllık otsu bir bitkinin olgunlaştıktan sonra toplanıp kurutulan tohumların öğütülmesiyle elde edilen ve Türk, Latin, Hint ve Arap mutfağında yaygın olarak kullanılan bir baharattır⁽⁵⁷⁾. Türkiye’de Konya, Ankara, Eskişehir, Niğde şehirlerinde yetiştirilmekte olan kimyon, genellikle geleneksel lezzetlerde, bunun dışında et, sebze, yumurta, peynir, sos, turşu, ekmeğin gibi ürünlerde kullanılmaktadır⁽³⁸⁾. Esansiyel yağ (%2.5-4.5) kimyonun en önemli kimyasal bileşenidir. Kimyonun ana bileşenleri simen (cymene) ve kimyon aldehit (cumin aldehide), terpenoidler olarak bildirilmiştir⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

Yapılan daha bir çok çalışmada kimyonun çeşitli mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu bildirilmiştir^(52,61-63). Özcan ve Erkmen⁽⁶⁴⁾, Türkiye’de yetişen kimyonun, esansiyel yağını Clevenger hidrodistilasyon method ile elde ettikten sonra, inceledikleri bütün mikroorganizma türleri (*S. typhimurium*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida rugosa*, *Rhizopus oryzae* ve *Aspergillus niger*) üzerine, *in vitro* olarak güçlü bir antimikrobiyal etkisi olduğunu, etki dozunun %1-15 arasında değiştiğini bildirmiştir. Küf türlerini inaktive etmek için (%10), mayalardan (%1) daha yüksek konsantrasyonlarda kimyon esansiyel yağı gerekmiştir. En yüksek antimikrobiyal etkinlik %15 oranındaki kimyon esansiyel yağı ile belirlenmiş ve incelenen tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olmuştur.

Behbahani ve ark.⁽⁶⁵⁾ tarafından, kimyon esansiyel yağının (KEY), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile *E. coli* ve *Listeria innocua*’ya karşı antimikrobiyal etkileri ve etki mekanizmasını, kimyasal bileşimi gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC-MS) ile, KEY’nun antimikrobiyal etkileri Kirby-Bauer, agar kuyu difüzyon, mikrodilüsyon ve minimum bakterisit/mantar öldürücü konsantrasyon (MBC/MFC), toplam fenol içeriği (TPC), Folin-Ciocalteu yöntemleriyle değerlendirilmiştir. KEY’nin ana bileşiminin küminal (%28.28) olduğu belirlenmiştir. Kimyon esansiyel yağının MİK ve MBC/MFC’si sırasıyla *P. aeruginosa* için 32-128, *E. coli* için 32-64, *S. aureus* için 2-8, *L. innocua* için 4-16 ve *C. albicans* için 2-4 mg/mL olarak belirlenmiştir. İncelenen

mikroorganizmaları öldürebilen minimum esansiyel yağ konsantrasyonunun, *C. albicans* için daha düşük olduğu ve bunu Gram pozitif ve Gram negatif bakteri türleri izlediği belirlenmiştir. Mayanın mikrobiyal büyüme baskılayıcı ajanlara karşı yüksek duyarlılığının mekanizması literatürde henüz bildirilmemiştir. Bakteri suşları üzerindeki inhibitör etkinin ortamdaki buhar agregasyonunun boyutuyla ilişkili olabileceği ve bu inhibe edici etkinin, aynı zamanda, morfolojik değişikliklere atfedilebileceği düşünülmüştür. Gram-negatif bakterilerin KEY’na Gram-pozitif olanlara kıyasla daha yüksek dirence sahip olmasının nedenini hücre zarlarının tek katmanıyla kıyasla daha karmaşık lipopolisakkarit bazlı yapısı ve gram pozitiflerin mukopeptidik yapısına atfedilmiştir. Lipopolisakkarit tabakanın Gram-negatif bakterilerin hücre zarları boyunca hidrofobik esansiyel bileşiklerinin difüzyon hızını sınırlayabileceği, ek olarak, hücre zarlarının lipid kısmındaki çözünürlük oranı ve antimikrobiyal ajanların (örneğin KEY) konsantrasyonu ve zar yüzeylerinin hidrofobikliği, bakteri hücrelerinin antibakteriyel bileşiklere karşı direncini etkileyebileceği düşünülmüştür. KEY’nin antimikrobiyal etkisinin, fenolik bileşiklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu biyoaktif bileşenler, oksitlenmiş bileşiğin enzimatik inhibisyonu yoluyla veya spesifik olmayan mekanizmalar yoluyla proteinlerin sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girerek, protein işlevselliğini değiştirerek mikrobiyal üremeyi önleyici roller oynayacağı vurgulanmıştır. Mikroskopik gözlemler ile, KEY’nin hücrelerin geçirgenliğinde artışa neden olduğunu ve zar bütünlüğünü bozduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, hücre şekli ciddi şekilde bozulmuş ve hücre ölümüne (MİK’de 24. saat) yol açmıştır⁽⁶⁵⁾. Kimyonun ve ana bileşenlerinin (küminaldehit ve simen) diğer mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etki mekanizmaları ile ilgili daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Kimyonun, probiyotik bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi ile ilgili az miktarda çalışma bulunmakla birlikte, Das ve ark.⁽⁶⁶⁾ tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, disk difüzyon ve MİK yöntemleri kullanılarak bazı Hint baharatları ve otlarının (bütün meyve, tohum veya yaprak şeklinde kimyon, çörek otu, hardal, çemen, ajan

(ajowain, karambol tohumu), köri yaprağı, muskat ve kına) bazı entero-patojenik, probiyotik veya gıda bozucu mikroorganizmalara (*S. enterica* serovar *typhimurium*, MTCC 3224, *Serratia marcescens* MTCC 4822, *S. aureus* MTCC 7405, *E. coli* MTCC 3221, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MTCC 6644, *P. vulgaris* MTCC 7299, *B. cereus* MTCC 6909, *L. brevis* MTCC 4460 ve *A. niger* suşu) karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çemen otu, hardal ve kınanın sulu ekstraktlarında en geniş inhibisyon bölgeleri (12-14 mm) saptanmıştır. *K. pneumoniae* ve *A. niger* en dirençli mikroorganizmalar olarak belirlenmiş iken, *S. aureus* ve *E. coli* en duyarlı suşlar olarak saptanmıştır. Sulu ve etanolik ekstraktların MİK analizi, test edilen suşlara karşı kimyonun en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermiş, bunu hardal, kına ve ajovan izlemiştir. *L. brevis* MTCC 4460 için MİK, sulu ekstrakt için 20 mg kuru ağırlık.ml⁻¹, etanol ekstraktı için 40 mg kuru ağırlık.ml⁻¹ olarak belirlenmiştir. Sulu ekstrakt-etanol ekstraktı MİK değeri *E. coli* için 10-15, *S. aureus* için 15-20, *S. enterica* için >50-25, *S. marcescens* için 15-20, *K. pneumoniae* için 10-25, *P. vulgaris* için 10-20, *B. cereus* için 10-40 ve *A. niger* için 30-50 mg kuru ağırlık.ml⁻¹ olarak saptanmıştır.

Viuda-Martos ve ark.⁽⁶⁷⁾, kekik otu (*Origanum vulgare*), kekik (*T. vulgaris*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), adaçayı (*Salvia officinalis*), kimyon (*C. cyminum*) ve karanfil (*S. aromaticum*) esansiyel yağlarının, gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılan *L. curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* ve *Staphylococcus xylosus* ve gıdalarda bozulmaya yol açan *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter amnigenus*'e bakterileri üzerine antibakteriyel aktivitelerini belirlemek için agar disk difüzyon yöntemi ile yaptıkları araştırmada, analiz edilen altı uçucu yağın tümünün, test edilen altı bakteri üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Kekik esansiyel yağı en yüksek inhibisyon etkisini gösterirken bunun ardından sırayla kimyon ve karanfilin geldiği saptanmıştır. Kimyon esansiyel yağı, 31.23 mm (*L. sakei*) ile 38.17 mm (*E. gergoviae*) arasında değişen inhibisyon zonu göstermiştir. *L. curvatus*, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından biyolojik ajanlar listesine dahil edilmiş, mükemmel fermantasyon özellikleri ve sağlık yararları nedeniyle çok dikkat çeken bir aday

probiyotiktir⁽⁶⁸⁾. *L. sakei*'nin probiyotik özelliği uzun zamandır bilinmektedir⁽⁶⁹⁾. *S. carnosus* ve *S. xylosus* dünya genelinde gıda fermentasyonunda starter kültürler olarak tek başına veya laktobasiller veya diğer mikroorganizmalarla kombinasyon halinde kullanılan iki ana stafilokok türüdür⁽⁷⁰⁾.

Tarçın (*Cinnamomum* Spp.)

Tarçın, anavatanı Güney ve Güneydoğu Asya olan, Defnegiller (*Lauraceae*) familyasından gelen, yaprak dökmeyen aromatik kokulu ağaç kabuklarının kurutulduktan sonra toz haline getirilmesi ile elde edilen ve yaygın olarak kullanılan oldukça aromatik bir baharattır⁽⁷¹⁾. *Cinnamomum* cinsinden tarçın ağaçlarından ticari olarak üretilen tarçının dört ana türü vardır: Gerçek tarçın, Seylan tarçını veya yumuşak tarçın olarak adlandırılan *Cinnamomum verum*, Çin tarçını veya Saygon tarçını olarak isimlendirilen *Cinnamomum cassia* (Kasya tarçını), korintje tarçını olarak adlandırılan *Cinnamomum burmannii*, kraliyet tarçını olarak isimlendirilen *Cinnamomum loureiroi*. Tarçında (*Cinnamomum zeylanicum*) izole edilen ve tanımlanan ana bileşikler polifenoller ve uçucu fenoller olmak üzere iki kimyasal sınıfa aittir⁽⁷²⁾. Sinmaldehit, sinnamil asetat ve sinnamil alkol tarçının üç ana bileşimidir. Fenolik bir bileşik olan öjenol ve aromatik bir aldehit olan sinmaldehit tarçında bulunan esansiyel yağlar olarak bildirilmiştir⁽⁷³⁾. Tarçın antimikrobiyal aktivitesi, inflamasyon, gastrointestinal bozukluklar ve idrar yolu enfeksiyonları gibi durumlarda sağlığı geliştirici ajan olarak kullanılır. Tarçının ana bileşeni olan sinmaldehit, hücre duvarı biyosentezini, membran fonksiyonunu ve spesifik enzim aktivitelerini inhibe ettiği için mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkilere sahiptir⁽³¹⁾. Tarçının gıda kaynaklı patojen bakterileri inhibe ettiğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾.

Tarçının antibakteriyel aktivitesi, sinmaldehit ve öjenol gibi biyoaktif fitokimyasallardan kaynaklanmaktadır. Tarçın kabuğu esansiyel yağının ve ana bileşenleri olan trans-sinmaldehit ve öjenolün, çocuklarda ve bağışıklığı baskılanmış yetişkinlerde enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenler olan *Cronobacter sakazakii* ve *Cronobacter malonicus*'a

karşı antibakteriyel aktivitesini belirlemek için yapılan bir araştırmada, *in vitro* olarak 19 bitki türeviden oluşan bileşik ve beş uçucu yağ test edilmiştir. Her iki suşun da timol, karvakrol, timokinon, p-simen, linalool, kafur, sitral, öjenol ve trans-sinmaldehitin yanı sıra tarçın, limon otu, kekik, karanfil ve defne esansiyel yağlarına duyarlı olduğu, minimum inhibitör konsantrasyonların 0.1 ve 2.0 mg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Timol, karvakrol ve trans-sinmaldehit en aktif bileşenler olarak saptanmıştır (MIK 0.1-0.3 mg/mL). Sonuçlar, sıvı ve buhar fazında tarçın esansiyel yağının MIK değerlerinin (0.25 ile 0.5 mg/mL arasında değişen) t-sinmaldehit için aynı koşullarda kaydedilenlere (0.128 ile 0.3 mg/mL arasında değişen) benzer olduğunu göstermiştir. Öjenol, daha düşük antibakteriyel aktiviteye işaret eden daha yüksek MIK değerleri (0.512 ile 1.0 mg/mL arasında) göstermiştir⁽⁷⁸⁾.

Buhar damıtma yolu ile elde edilen ticari tarçın esansiyel yağının (TEY) antibakteriyel etki mekanizmasını belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada *E. coli* ve *S. aureus*'un her ikisi için MIK değerleri 1.0 mg/ml, MBK sırasıyla 4.0 mg/mL and 2.0 mg/mL olarak belirlenmiştir. GC-MS analizi ile tarçın esansiyel yağının ana bileşeninin sinmaldehit (%92.4) olduğu doğrulanmıştır. SEM ile yapılan gözlemlerde, TEY eklendikten sonra, bakteri hücrelerinin morfolojisinde hücre hasarını gösteren bariz değişiklikler olmuş, MBK seviyelerinde tarçın EO eklendiğinde ise hücreler yok olmuştur. TEY, ilk birkaç saatte numunelerin elektrik iletkenliğinde hızlı bir artışa neden olarak küçük elektrolitlerin sızmasına neden olmuş ve ayrıca, hücre süspansiyonundaki proteinlerin ve nükleik asitlerin konsantrasyonu da yükselmiştir. Bu çalışma, tarçın EO'nun sitoplazmik zar üzerinde etki ederek zarın bütünlüğünü etkileyebileceğini ortaya koymuştur⁽⁷⁹⁾. Cui ve ark.⁽⁸⁰⁾ tarafından ticari tarçın esansiyel yağının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amaçlı gerçekleştirilen araştırmada, tarçın ana bileşenini öjenol (%75.52) olarak, MIK ve MBC değerlerini tüp dilüsyon yöntemi ile sırasıyla %0.025 ve %0.05 olarak belirlemişlerdir. Bu incelemelerde *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhi* B11, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *B. subtilis* IFO 3457, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus pumilus* ATCC 27142 suşları kullanılmıştır. Yapılan incelemeler tarçın

yağının mikrobiyal hücre zarına zarar verebileceğini göstermiş ve tarçın yağının mikrobiyal hücre zarına doğrudan zarar vermesinin ana antibakteriyel mekanizma olduğunu ima eden ATP ve DNA kaybı belirlenmiştir.

Behrad ve ark.⁽⁸¹⁾'nin, 28 günlük depolama süresince yoğurtta bulunan probiyotik bakteri düzeyini ve bitki ekstraktı eklenmiş yoğurdun *Helicobacter pylori* 'nin *in vitro* büyümesine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmasında, %6 sulu tarçın veya sulu meyan kökü ekstraktları ve probiyotik bakteriler (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve NCFM, *Bifidobacterium* Bb-12, *L. casei* LC 10) süte eklenerek fermente edilmiş ve soğukta depolama sırasında ve sonrasında probiyotik bakterilerin canlılığı değerlendirilmiştir. *H. pylori* üremesinin *in vitro* inhibisyonu, agar difüzyonu ve minimum inhibitör konsantrasyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktı eklenmiş yoğurt suyu numunelerinin her biri (25 µL), standart kağıt disklerle (Whatman, UK) emdirilmiş ve %7 koyun kanı (BML, Malezya) ilave edilmiş Columbia agar üzerine yerleştirilmiş ve besiyeri 0.1 mL miktarında iki farklı *H. pylori* süspansiyonu (10^8 - 10^9 cfu/ml) ile inkokule edilmiş ve inkubasyondan sonra inhibisyon zonları ölçülmüştür. Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK), *H. pylori* süspansiyonu ile inokulasyondan önce, çeşitli hacimlerde (0.25-3 mL) ısıtılmış (50°C) bitki içeren yoğurt suyu ekstraktı karıştırılmasıyla belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının varlığının, depolama sırasında probiyotik popülasyonunu etkilemediği gözlemlenmiştir. Tarçın-yoğurt-su özütü (13.5 mm), meyan-yoğurt özütü (11.2 mm) ile karşılaştırıldığında *H. pylori* üremesi üzerinde daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. 1 mL hacimde meyan kökü-yoğurt özü, her iki *H. pylori* suşu inhibe edici bir etkiye sahipken, tarçınlı yoğurt suşları için 3 ve 2 mL'lik bir hacimde *H. pylori* üremesini inhibe edebilmiştir. Tarçın ve meyan kökünün *H. pylori* üremesini azaltmak için biyoaktif bileşenlere sahip olduğunu sonucuna varılmıştır. Ancak bu bitki ekstraktı katılmış yoğurtların *H. pylori*'nin üremesini durdurmadaki etkinliği, midenin aşırı asidik ortamında da araştırılması gerektiği ifade edilmiştir.

Farklı starter kültürlerin farklı Mn^{2+} gereksinimleri vardır. Zaika ve Kissinger⁽⁸²⁾ baharatlarda bulunan

manganez iyonlarının (Mn^{2+}) starter kültürler için güçlü uyarıcılar olduğunu bildirmiştir. Bu geliştirici etkinin karanfil, kakule, zencefil, kereviz tohumu, tarçın ve zerdeçal gibi bitki kompenetlerinin asit üretimini artıran Mn^{2+} içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir⁽⁸²⁾. Fakat, tarçın esansiyel yağının *L. plantarum* 98L11, *L. plantarum* 62E11a, 62E21, *L. acidophilus* FRP728, *B. longum* FRP63 ve *B. breve* FRP67 karşı yüksek konsantrasyonda inhibisyon etki gösterdiği de bildirilmiştir⁽³⁴⁾. Aynı bitki veya baharatın uçucu yağları ile ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen antimikrobiyal bileşiklerinin etkinliği arasında farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir⁽⁸³⁾.

Zencefil (*Zingiber officinale*)

Zencefil, *Zingiberaceae* ailesinden, Asya, Çin, Hindistan ve Arabistan'da çok tercih edilen, tropikal yumru köklü sarımtırak bir bitkidir⁽⁵⁷⁾. Yumru biçiminde bir birine geçmiş yuvarlaklar şeklinde görünen kökleri rendelenerek ve dilimlenerek yemeklere katılabildiği gibi, kurutularak öğütülüp toz baharat şeklinde veya esansiyel yağı çıkarılarak kullanılabilir. Zencefilde bulunan zingerol, zingiberin ve bisabolen gibi komponentlerin antimikrobiyal aktivitesinin kaynağı olduğu rapor edilmiştir⁽⁴⁵⁾. Zencefilin patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir⁽⁸⁴⁻⁹⁰⁾. Fakat Sutherland ve ark.⁽²⁸⁾, zencefil köklerinin asidik yapıdaki sulu ekstraktlarının *L. reuteri* ve *L. rhamnosus*'un, pH 7 karakterli ekstraktların *L. reuteri* ve *B. lactis*'in gelişimini desteklediği bildirmiştir. Yine pH 7 organik çözücü ile elde edilen ekstraktların bütün probiyotik bakteriler üzerinde gelişimi destekleyici etkisi olduğunu saptamıştır. Bu geliştirici etkinin bitki komponentinde bulunan minerallerden (manganez iyonları, Mn^{2+}) ile ilgisi olabileceği düşünülmektedir⁽⁸²⁾.

Uçucu yağlar gıda patojenlerine karşı antibakteriyel aktivite gösterse de, bunların mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Zencefilin bakteri ve mantarlar üzerindeki etki mekanizmaları az çalışılmıştır ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır⁽³¹⁾. Wang ve ark.⁽⁹¹⁾, süper kritik CO_2 ve buhar damıtma kullanarak zencefil esansiyel yağının (ZEY), *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antibakteriyel

aktivitesi ve etki mekanizmasını belirlemek amaçlı yaptıkları araştırmada, GC-MS ile yapılan incelemeler sonucu ZEY'lerinin ana bileşenlerinin zingiberen ve a-kurkumen olduğunu ortaya konmuştur. ZEO'nun *S. aureus* için inhibisyon zonunun (IZ) çapı 17.1 mm, MIK 1.0 mg/mL ve MBK 2.0 mg/mL olarak; *E. coli* IZ 12.3 mm, MIK ve MBK değerleri sırasıyla 2.0 mg/mL ve 4.0 mg/mL olarak belirlenmiştir. ZEY'ların antibakteriyel mekanizmasının incelenmesinde, ZEY'lerinin doğrudan hücre zarına etki ettiği, hücre zarı yapısını tahrip ettiğini ve daha sonra hücre zarı geçirgenliğini artırarak bakterilerin temel yapısal işlevlerini kaybetmesine ve sonunda bakteri hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. ZEY'ların antibakteriyel mekanizmasının, bakteri proteinleri ve nükleik asitler gibi makromoleküler maddelerin sızıntısına yol açan bakteri hücre zarına verilen hasar olarak tanımlanmış ve nihayetinde bakteriyel metabolik aktivitenin azalmasıyla hücre ölümünün gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, ZEY'nin hidrofobik bileşikler, membranın lipofilik kısmı ve izole edilmiş mitokondri ile etkileşime girerek bütünlüklerini ve fonksiyonlarını (protein, nükleik asit, enerji metabolizması ve enzim aktivitesi) bozabileceği, bu nedenle, ZEY'ların mikrobiyal hücreleri etkilemek için çeşitli yolları olabileceği ifade edilmiştir.

Antimikrobiyal İçerikli Diğer Bazı Bitkiler

Aşağıda mutfağımızda yaygın olarak kullanılan ve antimikrobiyal özelliği bilinen diğer bazı bitkiler yer almaktadır.

Roka (*Eruca sativa*)

Bahçelerde yetiştirilen yapraklarının yakıcı lezzetli bir uçucu yağa ve bol miktarda vitamin C'ye sahip olan roka aynı zamanda kuersetin ve sinapik asit taşıyan bir yıllık ya da iki yıllık bir bitkidir⁽⁹²⁾. Ana vatanı Akdeniz bölgesi olan roka *Brassicaceae* familyasına aittir⁽⁹³⁾. Yapraklarından elde edilen uçucu yağ, yüksek oranda sülfür ve azot içeren bileşik bulundururken⁽⁹⁴⁾, tohum yağları ise erusik, linoleik ve linolenik asitleri içermektedir⁽⁹⁵⁾. Rokanın, başlıca faydalı özelliklerinin, C vitamini ve bazı mineral tuzlarının (demir, kalsiyum ve fosfor gibi) ve polifenoller

gibi diğer biyomoleküllerin varlığıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Roka tohumları göz hastalıklarında antiseptik, ekspektoran, tonik, stomaşik, diüretik, ayrıca afrodizyak ve antikanserojen olarak kullanılmaktadır. Taze yapraklarının ise uyarıcı öksürük kesici, diüretik olarak kullanıldığı bildirilmiştir⁽⁹⁶⁻⁹⁷⁾. Rokanın kök, yaprak/toprak üstünde kalan kısım ve tohum yağının antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır^(93,98).

Roka yapraklarının içerdiği glukozinolatlar (GSL'ler) işlemler sırasında yapraklar kesildiğinde veya ezildiğinde serbest kalır ve dokuda doğal olarak bulunan mirosinaz enzimi ile temas ettiğinde hidrolize olur, bu da alil izotiyosiyanatlar, metil-izotiyosiyanatlar ve 4-(metilsülfinil)-bütil-izotiyosiyanat, nitriller, gibi çeşitli aroma bileşenlerinin oluşumuna yol açar. Bu enzimatik parçalanma ürünleri, ppd düzeyinde bile algılanabilen oldukça keskin bir tat ve kokuya sahip olup bazılarının antibakteriyel, antifungal, antiprotozal ve nematosidal etkileri bilinmektedir. Örneğin alil izotiyosiyanatların *B. cereus* IFO-13494'e, *B. subtilis* IFO-13722, *E. coli* JCM-1649, *P. aeruginosa* IFO-13275, *S. enteritidis* JCM-1891, *S. aureus* IFO-12732, *Vibrio parahaemolyticus* IFO-12711, *S. typhimurium* ATCC14028, *S. cerevisiae* NFRI-3066, *C. albicans* IFO-1061, *A. niger* ATCC-6275) üzerine antibakteriyel aktivite sergilediği bildirilmiş ve *in vitro* olarak saptanan MİK değerleri 90, 110, 34, 54, 110, 110, 54, 54, 22, 22, 37 ng/mL olarak sıralanmıştır. Alil izotiyosiyanat etki mekanizması, bakteriyel membran özelliklerinin değişmesini, bakteriyel yüzey yükünün azalmasını ve bunun sonucunda potasyum sızıntısı ve propidyum iyodür alımı ile sitoplazma zarının bütünlüğünü tehlikeye girmesini şeklinde açıklanmıştır. Roka özünde ayrıca antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinen flavonoidler, alkaloidler ve terpenoidleri içerir. Bu tür bitki sekonder metabolitleri, membran fonksiyonunun ve yapısının (akış sistemi dahil) bozulmasına, DNA/RNA sentezi ve fonksiyonunun kesintiye uğramasına, ara metabolizma ile etkileşime, sitoplazmik bileşenlerin pıhtılaşmasının indüklenmesine ve normal hücre iletişiminin kesintiye uğramasına neden olabilir⁽⁹⁹⁾.

Roka, zengin polifenol kaynağıdır ve kuersetin, kaempferol ve isorhamnetin'in baskın olduğu flavonoidler içerir⁽¹⁰⁰⁾. Polifenoller, istilacı patojenlere

ve ultraviyole radyasyondan kaynaklanan hasara karşı koruma sağlamak için bitki savunma sistemlerinin ikincil metabolitleri olan fitokimyasallar sınıfıdır. Anti-bakteriyel, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-kanser, anti-diyabetik, obezitenin önlenmesi ve kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların önlenmesi gibi birçok sağlık etkileri vardır. Polifenollerin mikrobiyotayı etkileyebileceğine dair bazı kanıtlar da vardır⁽¹⁰¹⁾. Besinlerden ince bağırsak tarafından emilen diyet polifenollerinin oranı düşüktür, toplam tüketimin %5 ile %10'u arasında değişirken, emilmeyen polifenollerin %90-95'i bağırsak mikrobiyotası tarafından biyotransformasyona uğrayacakları kalın bağırsağa taşınır ve kolonik mikrobiyota tarafından basit fenolik asitlere, laktonlara ve muhtemelen diğer bileşiklere metabolize edilirler. Bağırsak mikrobiyal topluluğunun farklı substrat tercihleri ve metabolik yetenekleri nedeniyle, polifenol tüketimi bağırsak mikrobiyotasının bolluğu ve çeşitliliği ile ilişkili olabilir ve polifenollerin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki düzenleyici etkileri olduğu bilinmektedir⁽¹⁰²⁾. Örneğin insan dışı bakterileriyle toplu kültür fermentasyonu yapılmış, 150 ve 1.000 mg/L dozunda flavanoller [(+)-kateşin ve (-)-epikateşin] *Bifidobacterium* spp.'nin üremesini önemli ölçüde artırmış ve *E. coli* ile *Clostridium histolyticum* grubunun üremesini önemli ölçüde azaltmıştır. Hem (+)-kateşin hem de (-)-epikateşin, 150 mg/L'lik daha düşük konsantrasyonda daha iyi prebiyotik etkiler göstermiştir⁽¹⁰³⁾. Çay fenolikleri, saf kültürler ile %0.1 a/h dozunda 24 saat *in vitro* inkübasyon yapılmış ve kültür ortamında spektrofotometri ile yapılan sayımda *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* ve *Bacteroides* spp. gibi patojenik bakterilerin büyümesini engellemiş, probiyotikler (örn., *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp.) daha az etkilendirilmiştir⁽¹⁰⁴⁾.

Gıdalarda bulunan diyet lifleri ve polifenoller, bakteriler tarafından sağlığı teşvik eden kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ve fenolik asit metabolitleri üretmek için kullanılabilir. Galangan, kaempferol, kersetin ve mirisetin gibi flavonoller ve bunların ilgili glikozitleri, gıdalarda bulunan en yaygın flavonoidlerdir. Flavanollerin belirli bağırsak mikroorganizmaları üzerinde farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Fratianni ve ark.⁽¹⁰⁵⁾'nin araştırmasında,

simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında *E. sativa*'nın *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* suşlarının üremesi, canlı kalması ve bazı biyolojik özelliklerinin etkilenebileceği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada kuersetinin *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* ve *L. rhamnosus*'un üremesini *in vitro* olarak, 62.5 ile 250 µg/mL MIK dozunda engellediği bildirilmiştir⁽¹⁰⁶⁾. Rutin, 10 µg/mL'lik bir konsantrasyonda *Bifidobacterium* spp.'nin üremesini artırırken, rutin ve kuersetin, 100 µg/mL konsantrasyonunda, *Bifidobacterium* spp. popülasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır⁽¹⁰⁷⁾.

Soğan (*Allium cepa* L.)

Allium familyasına ait olan soğan dünyanın pek çok yerinde yetiştirilmektedir⁽¹⁰⁸⁾. Günlük kullanımda çiğ, pişmiş veya işlenerek farklı soğan ürünlerine dönüştürülür. Soğan protein, kalsiyum, sülfür, flor, provitamin A, B ve C vitaminleri, şeker ile %90 sudan oluşmaktadır. Yara, iltihaplar, ülser, soğuk algınlıklarını gidermek amaçlı tıbbi olarak Avrupa, Asya ve Latin Amerika toplumlarında kullanılmaktadır. Antik çağlarda ise soğan çayının kolera, ateş, baş ağrıları, gut gibi hastalıkları tedavi etmek için kullanıldığı ifade edilmiştir^(109,110). Soğan tüketiminin ayrıca kolonda spesifik mikroorganizmaların (*Bifidobacteria* ve *Lactobacilli*) büyümesini uyardığı bildirilmiştir. Soğanda kesildikten sonra açığa çıkan suyla birleştiğinde sülfürik asit oluşturan propanetial-S-oksitin adlı bir sülfür bileşiği bulunmaktadır. *in vivo* başlıca aktif antibakteriyel bileşenler, allisin türevli organo-kükürt bileşikleridir. Soğan yapısında bulunan 2 ana komponent, flavonoidler ve alk(en)il sistein sülfoksitlerdir. Soğanda, kuersetin ve kuersetin türevi flavonollerle birlikte özellikle 25 farklı flavonol bulunmaktadır. Soğanda bulunan bazı kuersetin oksidasyon ürünlerinin de antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Soğanın fenolik bileşikleri, bunlar içerisinde özellikle flavonoller, güçlü serbest radikal temizleyici ve antioksidan olarak bilinmektedir⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾.

Yapılan araştırmalar, biyolojik işlevlerin esas olarak soğandaki yüksek organo-kükürt bileşikleri içeriğinden kaynaklandığını göstermektedir. Organo-kükürt bileşiklerinin yanı sıra organo-selenyum

bileşikleri, flavonoller (kuersetin ve glikozitleri) ve diyet lifi (fruktanlar ve fruktooligosakkaritler (FOS)) soğanın biyolojik özellikleriyle de ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, saponinler ve peptitler gibi diğer soğan bileşenlerinin, antifungal, antitümör, antispazmodik ve kolesterol düşürücü aktiviteler ve osteoklastların gelişimini ve aktivitesini *in vitro* inhibe etme kapasitesi gibi faydalı sağlık etkileri olduğu gösterilmiştir. Soğan ekstraktının bir çok mikroorganizma (*E. coli*, *Salmonella typhosa*, *Shigella dysenteria*, *S. aureus*, *C. albicans*) üzerinde inhibe edici etkisi olduğu bildirilmiştir⁽¹¹⁴⁾. Soğanın güçlü antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle mikroorganizma üremesini kontrol etmek için gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanılabilme potansiyeli vardır. Ancak soğan uçucu bileşiklerinin güçlü tatları, keskin özellikleri ve biyokimyasal kararsızlıkları nedeniyle pratikte uygulanması sınırlı olacaktır. Bu nedenle muhtemelen daha kararlı olan fenolik bileşiklerin antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması yönünde artan bir ilgi vardır. Ayrıca bazı proteinler ve saponinler de bu aktiviteye katkıda bulunabilir⁽¹¹⁵⁾.

Soğanlarda bulunan iki flavonoid alt grubu, bazı çeşitlere kırmızı/mor renk veren antosiyaninler ve birçok çeşidin kabuğunda sarı ve kahverengi bileşiklerin üretiminde önemli rol oynayan kuersetin ve türevleri gibi flavonollerdir. Ayrıca, kabuğundan elde edilen fenolikler ve polifenoller ve soğanın yenilebilir kısmından (*Allium cepa* L.) elde edilen ekstraktlar da antimikrobiyal ve antibiyofilm özellikleriyle bilinir. Soğan kabuğu atıklarının da iyi antibakteriyel ve antioksidan özellikleri olduğu bildirilmiştir⁽¹¹⁶⁾. Soğan kabuğu atığı ekstraktlarının *E. coli*, *P. fluorescens* ve *B. cereus* bakterilerine ve *A. niger*, *Trichoderma viride* ve *Penicillium cyclopium* mantarlarına karşı yüksek antimikrobiyal aktivitesi gözlemlenmiştir⁽¹¹⁷⁾. Üç İspanyol soğan çeşidinin metanolik ekstraktlarının etil asetat ve su alt fraksiyonlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi test edildiği bir araştırmada kuersetin ve kaempferol, *B. cereus*, *S. aureus*, *M. luteus* ve *L. monocytogenes* gibi gram pozitif bakterilere karşı inhibitör olduğu, Gram negatif bakteriler (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) hem flavonol standartlarının antimikrobiyal etkisine daha az duyarlı olduğu ve *C. albicans*'ın ise tamamen dirençli olduğu belirlenmiştir⁽¹¹⁸⁾. Test edilen soğan özleri arasında

sadece etil asetat alt fraksiyonu antimikrobiyal inhibisyon göstermiştir. Sharma ve ark.⁽¹¹⁶⁾, altı farklı çeşit soğanın metanolik ekstraktlarının kuersetin, toplam fenolikler, flavonoidler, antioksidanlar, antibakteriyel ve antibiyofilm özelliklerini incelemişlerdir. Ekstraktlardaki toplam fenolik içerik, Folin-Ciocalteau'nun fenol reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak, toplam antioksidan aktivite FRAP ve DPPH yöntemleriyle, ekstraktların *in vitro* antibakteriyel aktiviteleri Gram negatif (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) ve Gram pozitif (*S. aureus* ve *B. cereus*) bakterilere karşı modifiye Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak, antibiyofilm aktivitesi, kristal menekşe tahlili ile saptanmıştır. Altı çeşit soğanın tümünde depoda bekletme ile toplam fenolik ve antioksidan içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Kırmızı kabuklu soğanlarda üç ay sonra, en yüksek toplam fenolik (5110.07 ± 196.56 µg GAEg-1FW) ve toplam flavonoid (2254.00 ± 154.82 µg QEG-1 FW) belirlenmiştir. Kırmızı soğan ekstraktının antibakteriyel aktivitesinin sarı ve beyaz çeşitlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kırmızı çeşitten elde edilen soğan özütü potansiyel antibiyofilm aktivitesi de göstermiştir. Antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerini düzenleyen önemli faktörlerin, farklı seviyelerde biyoaktif bileşiklerin varlığından kaynaklandığı ifade edilmiştir. Gram pozitif bakteriler için en yüksek inhibisyon bölgesi kırmızı soğan özü için 13.5 ± 0.9 mm, sarı soğan özü (Sinsunhwang) için ise 11.3 ± 0.7 mm olarak gözlemlenmiştir. Öte yandan, Gram negatif bakteriler için inhibisyon bölgesinin nispeten daha küçük olduğu bulunmuştur. Beyaz soğan özleri, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı zayıf veya hiç inhibisyon aktivitesi sergilememiştir.

Lasik ve ark.⁽¹¹⁹⁾, soğan, sarımsak ve kekik sulu ekstraktlarının, sindirim sürecindeki antibakteriyel özelliklerinin, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak olmak üzere üç aşamadan oluşan insan gastrointestinal sistemi modelinde *in vitro* değerlendirilmesi amacıyla yapılan araştırmasında, seçilen baharatlar ve bitki materyallerinin eklendiği eriştelere antibakteriyel aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Antagonistik özellikler insan kalın bağırsağından izole edilen *E. coli*, *E. faecium*, *B. animalis* ve *L. plantarum* bakterilerine karşı araştırılmıştır. Test edilen bakteri suşlarına karşı soğan ve soğan ilaveli eriştelere en

yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösterirken, en düşük etki ise kekik ve kekikli eriştelere gözlenmiştir. En yüksek bakteri inhibisyon etkisi genellikle, düşük pH'ında katkıda bulunduğu mide aşamasında tespit edilmiştir.

Fenolik maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde etki sahibi olan faktörler arasında pH ve sıcaklık değerleri öne çıkmaktadır⁽¹²⁰⁾. Sutherland ve ark.⁽²⁸⁾, soğanın asidik sulu ekstraktlarının *L. rhamnosus* ve *L. reuteri* üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu saptamıştır. Nötr sulu ekstraktlarının sadece *L. reuteri* üzerinde geliştirici etki gösterdiğini tespit etmiştir. Organik çözücülerle hazırlanan nötr ve asidik ekstraktlardan sadece asidik olanının *L. reuteri* üzerinde hiçbir etkisi gözlemlenmezken, diğerlerinin geliştirici etkisi olduğu saptanmıştır. Asidik sulu ekstraktlarının *L. rhamnosus* ve *L. reuteri* üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu bildirmiştir.

Soğangiller familyasının en küçük türü olan Frenk soğanının (*Allium schoenoprasum* L.) su, metanol ve etil asetat ile hazırlanan ekstraktlarının *E. coli*, *S. aureus*, *Shigella dysenteriae* ve *L. acidophilus* üzerine disk difüzyon yöntemi ile *in vitro* antibakteriyel etkisinin incelendiği bir araştırmada, %20, %40, %60 ve %80 konsantrasyonda, *E. coli*, *S. aureus*, *S. dysenteriae* üzerinde inhibisyon gösterirken, *L. acidophilus* için herhangi bir inhibisyon zonu görülmemiştir. Bu nedenle probiyotik gıdalarda, frenk soğanı ekstraktının kullanımının mümkün olduğu sonucuna varılmıştır⁽¹²¹⁾.

Adaçayı (*Salvia officinalis*)

Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait olan adaçayı, dünya üzerinde 900 alt türü bulunan kokulu bir bitkidir. Latince korumak, iyileştirmek anlamına gelen *Salvia* kelimesinden ismi gelmektedir. Özellikle Batı Anadolu ve Yunanistan olmak üzere Akdeniz ve çevresinde yetişmektedir. Ülkemizde *Salvia* türü sayısı 92 olmakla birlikte bunların yarısı endemiktir ve birçok ilimizde birden fazla endemik adaçayı bulunmaktadır⁽¹²²⁾. *Salvia officinalis* güney sahillerimizde 1300-1500 m'de yetişmektedir⁽¹²³⁾. Adaçayının bilinen biyolojik etkileri; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiseptik, analjezik, antioksidan,

astrenjan, antispazmodik, halusinogenik, merkezi sinir sistemi depresanı, antidiyabetik, antikanser, tüberkülostatik, kardiyovasküler ve insektisit aktiviteler olarak sıralanabilir⁽¹²⁴⁻¹²⁷⁾. Adaçayı; eterli uçucu yağlar; tujon, sineol, linalol, borneol, salven, pinen ve kafur; saponinler, tanenler, fenolik bileşikler (terpenik bileşikler, fenolik asitler, flavonoidler ve fenolik glikozitler), östrojen benzeri maddeler, reçineli bileşikler ve bazı uçucu yağları timol ve karvakrol da içermektedir^(128,129). *Salvia officinalis* bitkilerinden buhar damıtma yöntemi kullanılarak elde edilen uçucu yağların GC-MS ile yapılan kimyasal analizi ile otuz dört bileşik tanımlanmış, ana bileşenlerin kafur (%23.3), α -thujone'un (%14.6), 1.8-cineole (%5.72) ve limonene (%4.04) olduğu belirlenmiştir⁽¹³⁰⁾.

Farklı adaçayı türlerinin (*Salvia aucheri* L., *Salvia fruticosa* subsp. *hirtum*, *Salvia officinalis* L.) antimikrobiyal etkisi çeşitli istenmeyen mikroorganizmalara karşı bildirilmiştir^(21,45,131). *S. officinalis*'in antimikrobiyal etkileri bu bitkide bulunan terpenler ve terpenoid bileşiklerine atfedilir. Horiuchi ve ark.⁽¹³²⁾, *Salvia officinalis*'ten (adaçayı) elde edilen ham bir özütün (aseton ekstraktı), vankomisine dirençli enterokoklarda (VRE) aminoglikozitlerin minimum inhibitör konsantrasyonlarını azalttığını, yani aminoglikozitlerin antimikrobiyal aktivitesini güçlendirdiğini tespit etmişler ve özütten izole ettikleri etkili bileşiği diterpenoidlerden biri olan karnosol olarak tanımlamışlardır. Adaçayı'nda bulunan kafur, thujone ve 1,8-cineole'nin *A. hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. cereus* ve *Klebsiella oxytoca*'ya karşı; oleanolik asit ve ursolik asitin, vankomisine dirençli enterokoklar, penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* ve metisiline dirençli *S. aureus*'a; antibakteriyel etkisi bildirilmiş ve ayrıca antibakteriyel etkiye ek olarak, *S. officinalis*'in antifungal, antiviral ve anti-malaryal etkileri indüklediği rapor edilmiştir⁽¹³³⁾.

Roldán ve ark.⁽⁴⁶⁾ ise *S. officinalis*'in ticari esansiyel yağının birkaç gıda kaynaklı patojen ve probiyotik bakterilere karşı (*L. acidophilus* ATCC 4356 ve *B. breve* ATCC 15700) antimikrobiyal aktivitesini agar dilüsyon metodu ile incelemiştir. *L. acidophilus*'a karşı MBK değeri 80 mg/mL olarak tespit edilirken, *B. breve*'e karşı bu değer 40 mg/mL olarak saptanmıştır. *E. coli*

ATCC 25922, *E. coli* O157, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *S. typhimurium* ATCC karşı bu değerler sırasıyla mg/mL cinsinden 80, 40, 80 ve 40 olarak belirlenmiştir.

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)

Yurdumuzda genel olarak Güney ve Kuzey Anadolu ve adalarda; özellikle Mersin ve Adana yörelerinde maki florası içinde, orman boşluklarında, tarla ve üzüm bağı kenarlarında doğal olarak yetişen, Çanakkale (Erenköy, İçel (Tarsus), Yüreğir (Mustafa Köyü) ve Hatay (İskenderun)'da süs bitkisi olarak yetiştirilen kuşdili, hasalban, akpüren olarakta bilinen biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), çiçekleri soluk mavi renkli, çok yıllık bir bitkidir⁽¹³⁴⁾. Dünyada ise Fransa'nın güneyinden başlayarak Afrika'nın kuzeyinde yer alan Tunus ve Cezayir kıyılarına kadar geniş bir alanda yayılış göstermektedir. Aynı zamanda Akdeniz ülkeleri, ABD ve İngiltere'de de üretilip, süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir⁽¹³⁵⁾.

Biberiye bitkisi geleneksel tıpta, kozmetikte ve gıdalarda aroma maddesi olarak kullanılmaktadır. *Rosmarinus officinalis* esansiyel yağının, antibakteriyel, sitotoksik, antimitojenik, antioksidan, antiflojistik ve kemopreventif özellikleri bulunmaktadır. Biberiye yağının başlıca bileşenleri, %20 α -pinen, %20 1.8 sineol, %18 kafur, %7 kamfen, %6 β -pinen, %5 borneol, %5 mirsen, %3 bornil asetat, %2 α -terpineol olarak bildirilmiştir⁽⁹⁴⁾. Başka bir araştırmada, biberiye esansiyel yağının gaz kromatografisi ile kimyasal analizi yapılmış ve başlıcaları alfa-pinen (%23.93), kamfen (%8.7), kafur (%10.97), verbenon (%15.44), p-simen (%7.48) ve 3-oktanon (%5.63) olan 11 bileşik belirlenmiştir⁽¹³⁶⁾.

Günümüzde biberiye ekstraktı yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip olduğu için ticari olarak gıda stabilizasyonu ve et ürünlerinde kullanılmaktadır⁽¹³⁷⁾. Biberiyenin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi olduğu bir çok çalışmada bildirilmiştir⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾. Biberiye esansiyel yağlarının, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. typhimurium* ATCC 14028, *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *B. breve* ATCC 15700 üzerinde minimum bakteriyosidal

konsantrasyonları (MBK) sırasıyla mg/mL cinsinden 20, 10, 40, 40, 80, ve 80 olarak belirlenmiştir⁽¹⁴⁶⁾.

Hidro-damıtma ile elde edilen biberiye uçucu yağı gaz kromatografi-kütle spektrometrisi ile analiz edildiği bir araştırmada ve altmış iki bileşen tanımlanmış; oksijenli monoterpenlerin baskın bileşenler olduğu belirlenmiştir. Biberiye yağında, kafur (%18.9), verbenone (%11.3), a-pinen (%9.6), beta-mirsene (%8.6), 1,8-sineol (%8.0) ve beta-karyofillen (%5.1) tespit edilmiştir. Yağın ve ana bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitesi, dış çürüklerinin oluşumundan sorumlu olan *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* ve *E. faecalis* gibi mikroorganizmalar ile minimum inhibitör konsantrasyonun belirlenmesi için mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Uçucu yağ, seçilen mikroorganizmalara karşı düşük aktivite gösterdiği (500->2000 µg mL⁻¹), saf ana bileşiklerin uçucu yağdan daha aktif olduğu, en duyarlı patojenin *S. mitis* ve dirençli olanın *E. faecalis* olduğu belirlenmiştir⁽¹⁴¹⁾. Biberiye uçucu yağı *S. aureus* (NCTC 6571), *B. cereus* (ATCC 11778), *B. subtilis* (NCTC 10400), *Bacillus pumilis*, *P. aeruginosa* (NCTC 1662), *Salmonella poona* (NCTC 4840), *E. coli* (ATCC 8739) ve amfisiline dirençli *E. coli* (NCTC 10418) olmak üzere sekiz bakteri türüne karşı test edilmiştir ve disk difüzyon testinin ardından modifiye rezazurin testinin sonuçlarına göre, Gram-pozitif bakterilere (inhibisyon zonu (IZ) 18.0-24.2; MIK 0.20-0.48mg mL⁻¹) Gram-negatif bakterilerden (IZ:12.8-17.5; MIK 1.16-1.72 mg mL⁻¹) daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir⁽¹⁴²⁾.

Nane (*Mentha piperita* L.)

Nane bitkisi, *Lamiaceae* familyasına ait, Çin, Japonya, Brezilya, Güney Afrika, Tayvan ve Arjantin'de yaygın olarak yetiştirilmekte olan, otsu, aromatik, çok yıllık bir bitkidir^(38,143,144). Mentol, karvon, menton ve pulegon gibi ana bileşenleri içeren uçucu yağa sahip 25'ten fazla nane türü bulunmaktadır⁽¹⁴⁵⁾. *Mentha piperita* (İngiliz nanesi), *Mentha arvensis* (Japon nanesi) ve *Mentha spicata* (Bahçe nanesi) dünyada kültürü yapılan 3 önemli nane türüdür⁽¹⁴⁶⁾. İhtiva ettiği değeri yüksek uçucu yağları yüzünden

birçok ülkede ticari olarak kültürü yapılmaktadır. Ülkemizde ise Akdeniz iklim kuşağında yetiştirilmekte olan nane, Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde kültür bitkisi olarak üretilmektedir. Ticari olarak öneme sahip olan nane, tıbbi açıdan spazm, gaz giderici, mide rahatlatıcı, serinletici, uyarıcı ve diüretik etkileri nedeniyle eskiden beri ülkemizde kullanılmaktadır⁽¹⁴⁶⁾. Nananın mevsime, iklime ve bitkinin yapısına göre değiştiği bildirilen bileşenleri genel olarak α-mentol, neomentol, isomentol, d-menton, isomenton, mentofuran, metilasetat, karyomenton, sineol, limonen, piperiton, β-pinen, karvakrol, α-pinen, dipenten gibi terpenleri olarak bildirilmiştir. Bunun yanında nanenin kuersetin, mentosin ve isoroifolin, K vitamini, timol ve öjenol gibi flavonoidleri de ihtiva ettiği belirtilmiştir. Bütün bu bileşenlerin serbest radikalleri önleyici ve antioksidan etkisinin bulunduğu bildirilmiştir⁽¹⁴⁷⁾.

Mentha cinsinin bitkilerin kimyasal bileşimi, çevresel (büyüme yeri, toprak özellikleri, nem varlığı, sıcaklık vb.), fenolojik (bitki toplama aşaması), ekstraksiyon için kullanılan bitki kısmı (çiçekler, gövdeler, yapraklar, tüm hava kısımları veya çiçek salkımları), malzeme türü (taze veya kuru) ve hatta kimyasal analiz için kullanılan yöntemler gibi birçok faktör nedeniyle farklılıklar göstermektedir. Rosmarinik asit, luteolin-7-O-glukozit, salvianolik asit, eriositrin ve hesperidin, nane türlerinde başlıca uçucu olmayan bileşenler olarak bulunmuştur. Antolak ve ark.⁽¹⁴⁸⁾'nin çalışmasında kullanılan nane etanol ekstraktında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gallik, klorojenik, neoklorojenik, p-kumarik, ferulic, fenolik asitler, rosmarinik asitler ve ayrıca epikateşin, kuersetin-3-rutinosit ve kuersetin belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivitesinin, test edilen nane ekstraktında bulunan çeşitli biyoaktif bileşiklerin sinerjistik etkilerinin nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmüştür. Gallik ve kafeik asitlerin, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belgelenmiştir. Ayrıca mentolün, ekstrakte edilen diğer bileşiklerden (linalil asetat, limonen, β-pinen, α-pinen, kafur, linalool ve 1,8-sineole) daha aktif olduğu belirlenmiştir. Genel olarak, Gram pozitif bakteriler için hem nane özlerinin hem de uçucu yağlarının daha iyi aktivite gösterdiği, bunun da muhtemelen, Gram-negatif bakterilerin daha

düşük duyarlılığı, farklı antimikrobiyal ajanlara karşı koruma sağlayan, dış membranlarında hidrofobik lipopolisakaritlerin varlığından kaynaklandığı ve bu yapının depolarizasyonu, gözenek oluşumunu ve membran geçirgenliğinin artmasını engellediği ifade edilmiştir.

Nanenin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin belirlendiği bir çok çalışma bulunmaktadır⁽¹⁴⁹⁻¹⁵²⁾. Türkiye’de yetişen nane türleri (*Mentha spicata* L.)’den elde edilen nane esansiyel yağının, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. cerevisiae*, *C. rugosa*, *R. oryzae* ve *A. niger* üzerine antimikrobiyal etkinliğinin *invitro* olarak belirlenmesi amaçlı yapılan birkaç çalışmada ise incelenen hiçbir bakteri türüne karşı antimikrobiyal etkisi belirlenememiştir⁽⁶⁴⁾. Karanfil ve nanenin esansiyel yağlarının *L. rhamnosus*’u sublethal strese soktuğu tespit edilmiştir⁽³³⁾. Agar dilüsyon yöntemi ile yapılan başka bir çalışmada, *M. spicata* ve *M. piperita*’nın buhar distilasyonu ile elde edilen esansiyel yağının *L. acidophilus*’a karşı herhangi bir etkisi saptanamazken (80 mg/mL minimum bakteriyosidal konsantrasyonuna kadar), *B. breve* için MBK değerleri sırasıyla 10 ve 40 mg/mL olarak saptanmıştır⁽⁴⁶⁾. Bu farklılıkların nane bileşenlerinin mevsim, iklim çeşidi, toprak gibi etmenlerden dolayı farklılık göstermesinden, etken maddenin ekstaksiyon yönteminden, MİK belirlenme yönteminden ve deneme yapılan mikroorganizmalardan kaynaklanıyor olabilir.

Sarımsak

Sarımsak *Liliaceae* familyasına eski çağlardan beri kullanılan çok yıllık otsu bir bitkidir⁽³⁸⁾. Geçmişte sarımsağın yemeklere tat vermek amacıyla eklenmesi dışında hastalıkların tedavisinde de kullanıldığı bilinmektedir⁽¹⁵³⁾. Türkiye ve Dünyada pek çok mutfakta kendine has tat ve kokusu nedeniyle önemini koruyan sarımsak gıda sanayinde daha çok toz olarak tercih edilmekle birlikte salata, çorba, sos, kurutulmuş ve dondurulmuş gıdalarda kullanılmaktadır^(38,154). Sarımsağa tipik kokusunu veren diallil tiyosülfünattan izole edilen, %0.2-0.4 civarında bulunan ‘allisin’ bileşiği sarımsağın antimikrobiyal özelliğinin en önemli kaynağıdır. Fakat

sarımsak dişleri bütün haldeyken allisin oluşumu gözlemlenmemektedir, ancak ezildiğinde oluşan allinaz enzimi ile çabucak ortaya çıkmaktadır⁽¹⁵⁵⁾. Allisinin yanı sıra bir diğer antimikrobiyel madde olarak ‘alojen’ bildirilmiştir⁽¹⁵⁶⁾. Sarımsağın bakteriler üzerindeki etki mekanizmasının, allisinin –SH grupları ile etkileşimine bağlı olduğu ve asetil CoA sentezini inhibe etmesiyle birlikte lipid sentezini engellemesi ile gerçekleştiği bildirilmiştir⁽¹⁵⁷⁾. Sarımsak, maya ve küfler üzerinde ise protein ve nükleik asit sentezini engelleyerek etkide bulunmaktadır⁽¹⁵⁸⁾. Ülkemizde et ve sebze yemeklerinde, yoğurtlu veya yumurtalı yiyeceklerde, çorbalarda, sos yapımında, turşularda, pastırma, sucuk gibi ürünlerin yapımında sıklıkla kullanılan sarımsağın önemli ölçüde tarımı yapılmaktadır⁽³⁸⁾. Sarımsak (*A. sativum*) geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Sarımsakta bulunan alisin, *Escherichia*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus* ve *H. pylori* gibi Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı inhibitör aktivite gösteren organasülfür bir bileşiktir^(159,160). Avato ve ark.⁽¹⁶¹⁾, alisin, diallil tiyosülfünik asit veya diallil disülfidin sarımsağın antimikrobiyal etkisinden sorumlu olduğunu bildirmiştir. Son zamanlardaki çalışmalar organasülfür bileşiklerin sarımsaktaki fenolik bileşiklerden daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Lv ve ark.⁽¹⁶²⁾, sarımsaktan elde edilen organasülfür bileşiklerin *Campylobacter jejuni* üzerinde fenolik bileşiklerinden daha etkili olduğunu saptamıştır. Sarımsağın *E. coli*, *Salmonella*, ve *A. hydrophila* üzerinde yüksek oranda bir antimikrobiyal etkisi olduğu bildirilmektedir⁽¹⁶³⁾. Indu ve ark.⁽¹⁶⁴⁾, sarımsak sulu ekstraktının, 20 farklı *E. coli* sero grubuna, 8 *Salmonella* serotipine, *L. monocytogenes* ve *A. hydrophila*’ya karşı antimikrobiyal etkinliğini agar kuyusu ve disk difüzyon yöntemleri kullanarak değerlendirmiş ve sarımsak özütü *L. monocytogenes* hariç tüm test organizmalarına karşı mükemmel antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirlemiştir. Kağıt disk yöntemiyle test edildiğinde, baharatların antibakteriyel etkinliğinin daha az belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Chen ve ark.⁽¹⁶⁵⁾’nin farklı sarımsak ekstraktları (etanol, metanol, su) ile yapılan araştırmasında, sarımsak özlerinin mikroorganizmaları (*Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium proliferatum* ve *Alternaria brassicicola*)

öldürme mekanizmasının sitoplazmik zarın bozulmasından kaynaklanıyor olabileceği şeklinde değerlendirmişlerdir. Sarımsak ekstraktlarının bakteri hücre zarının tahrip olmasına ve hücre materyalinin sızmasına neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Rees ve ark.⁽¹⁶⁶⁾, dondurularak kurutulmuş sarımsak sulu özütünün *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *E. faecium*, *Pediococcus pentasaceus*, *Pediococcus pentasaceus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. En dayanıklı bakteri suşları pediokoklara ait bulunurken en düşük MIK değerine laktobasillerin sahip olduğu saptanmıştır. Bakteri ve mayalar için minimum inhibitör konsantrasyon 0.8 to 40.0 mg sarımsak ml⁻¹ olarak belirlenmiştir. Booyens ve Thantsha⁽¹⁶⁷⁾, suda çözünabilir farklı oranlarda hazırlanan sarımsak dişi, sarımsak tozu, sarımsak ezmesi ve sarımsak baharatı ekstraktlarının *B. lactis* bb12, *B. longum*, *B. lactis* bi07 ve *L. acidophilus* la14 suşlarına karşı disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Sarımsak ekstraktları için MIK değerleri 75.9-303.5 mg /mL arasında değiştiği saptanmıştır (tahmini 24.84 ile 99.37 ug/mL allisin). *B. lactis* Bi07 300B, sarımsaklara karşı en dirençli olup, bunu *B. lactis* Bb12, *B. longum* LMG 13197, *B. longum* Bb356 ve *B. bifidum* 11041 takip etmiştir. Sarımsak ile birlikte probiyotik amaçlı Bifidobakteri kullanıldığında dikkatli olunması gerektiği ifade edilmiştir. Sarımsak preparatlarına Bifidobakteri suşları arasında duyarlılık farkı gözlenmiştir. Farklı suşlar için sarımsağın antimikrobiyal etkilerine duyarlılıkları konusunda genelleme yapılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Chen ve ark.⁽¹⁶⁸⁾ *Streptococcus mutans* için bu durumu kısmen farklı suşlardaki farklı hücre yüzeyi kompozisyonundan kaynaklandığı şeklinde açıklamıştır.

Sutherland ve ark.⁽²⁸⁾, 37 adet gıdadan elde edilen 148 adet sulu nötr, sulu asidik, organik etilasetat ve organik trifloroasetik asit ekstraktının belirli probiyotik (*L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *B. lactis*) ve patojen bakterilere karşı etkisi incelemişlerdir. Sarımsağın asidik sulu ekstraktlarının (pH 2) incelenen bütün probiyotik bakteriler üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu, nötral sulu ekstraktlarının ise gelişimi teşvik ettiğini saptamıştır. Organik çözücülerle elde edilen nötral ekstraktların ise probiyotik bakteriler üzerinde gelişimi teşvik edici etkisi olduğunu bildirmiştir⁽²⁸⁾.

Genel olarak, sulu gıda ekstraktlarının daha büyük etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Sulu ekstraktlarda bulunan ana bileşenlerin şekerler ve küçük proteinler bulunması, fenolikler ve organik asitler gibi bazı gıdaya özgü fitokimyasal sınıfların da içerikte olduğu tahmin edilmiştir. Test edilen gıdalardan birkaçı için, organik çözücü ile ekstrakte edilebilen bileşenler aktivite göstermiştir. Bu ekstraktların, önemli miktarda daha fazla hidrofobik bileşen içeren sulu ekstraktlarda bulunandan biraz farklı bir kimyasal bileşime sahip olmasıyla ilişkili olabileceğine atfedilmiştir ve ekstraktların tam niteliği ve bileşimi araştırması gerektiği ifade edilmiştir. Ross ve ark.⁽¹⁶⁹⁾, yaptığı çalışmada *L. acidophilus*'un sarımsak yağına karşı hassasiyeti olduğunu saptamıştır. Naganawa ve ark.⁽¹⁷⁰⁾, ise sarımsaktan elde edilen ajoene komponentinin 20 mg/mL düzeyinin altında *L. plantarum*'a karşı inhibe edici etkisi olduğunu gözlemlemiştir.

SONUÇ

Baharatlar ve yenebilir bitkilerin bilinen antimikrobiyal etkileri fenolikler, uçucu yağlar vb. gibi içerdiği kimyasal bileşikler ile ilgilidir. Yapılan literatür taramasında baharat ve bitkilerin bir çoğunun probiyotikler üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu görülmektedir. Özellikle kekik ve sarımsağın probiyotik bakteriler üzerine bu etkisi bir çok çalışmada vurgulanmıştır. Bununla birlikte bazı baharat ve bitkilerin probiyotiklerle ilişkisi konusunda literatürde çelişkili sonuçlar da bildirilmiştir. Bitkilere özgü antimikrobiyal etkili bileşiklerin miktarı tür, yetiştirildiği toprağın özellikleri, iklim, sulama gibi faktörlerden etkilenmektedirler. Aynı zamanda bu bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler, ekstraksiyonda kullanılan çözücünün niteliği gibi unsurlar da antimikrobiyal etkinin derecesi üzerinde belirleyici olmaktadır. Gıdalarda sentetik kimyasallardan kaçınma ve doğal bileşenlere yönelim nedeniyle, baharat ekstrakt ve esansiyel yağlarının patojen bakteriler ve bozulmaya yol açan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. COVID-19 pandemisi ile birlikte antimikrobiyal özelliği olan bitki ekstraktlarını içeren gıda takviyelerinin kullanımı da artmıştır. Bu baharat ve bitkilerin ekstrakt, esansiyel yağ ve bileşenlerinin

probiyotik bakteriler üzerinde destekleyici ve inhibe edici etkilerinin *invitro* ve *invivo* araştırılması konusunda oldukça az bilimsel çalışma yapılmıştır. Bitkisel antimikrobiyallerin gıda üretiminde kullanılan starter kültürler ve probiyotik bakteriler üzerindeki etkilerinin ve bitkisel gıda takviyelerinin dozajlarının ve vücuttaki probiyotikler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

KAYNAKLAR

- Akpınar A, Erk G, Seven A. Vegan ve vejetaryan beslenmede probiyotik bitkisel bazlı süt ürünlerinin yeri. *Gıda*. 2019;44(3):453-62. <https://doi.org/10.15237/gida.GD18083>
- Kareb O, Aider M. Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: a critical review. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019;11(2):348-69. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9427-6>
- Maftai NM. Probiotic, prebiotic and synbiotic products in human health. Solís-Oviedo RI, Pech-Canul AC (eds) *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages* (kitabında). IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81553>
- Roy P, Kumar V. Functional food: probiotic as health booster. *J Food Nutr Popul Health*. 2018;2(2):12. <https://doi.org/10.21767/2577-0586.100042>
- Vázquez-Fresno R, Rosana ARR, Sajed T, Onookome-Okome T, Wishart NA, Wishart DS. Herbs and spices-biomarkers of intake based on human intervention studies—a systematic review. *Genes Nut*. 2019;14:18. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0636-8>
- El-Sayed SM, Youssef AM. Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon*. 2019;5(6):e01989. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01989>
- Karakol P, Kapi E. Use of selected antioxidant-rich spices and herbs in foods. Waisundara V (ed): *Antioxidants - Benefits, sources, mechanisms of action* (kitabında), IntechOpen, 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96136>
- Chakraborty M, Afrin T, Munshi SK. Microbiological quality and antimicrobial potential of extracts of different spices. *Food Res*. 2020;4(2):375-9. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(2\).303](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(2).303)
- Horváth P, Koščová J. In vitro antibacterial activity of mentha essential oils against *Staphylococcus aureus*. *Folia Vet*. 2017;61(3):71-7. <https://doi.org/10.1515/fv-2017-0030>
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):564-82. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Ferdes, M. Antimicrobial compounds from plants. *Fighting Antimicrobial Resistance*. IAPC-OBP, Zagreb, 2018;243-271.
- Khorshidian N, Yousefi M, Khanniri E, Mortazavian AM. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2018;45:62-72. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.020>
- Stojiljkovic J, Trajchev M, Nakov D, Petrovska M. Antibacterial activities of rosemary essential oils and their components against pathogenic bacteria. *Adv Cytol Pathol*. 2018;3(4):93-6. <https://doi.org/10.15406/acp.2018.03.00060>
- Nisha P, Singhal RS, Pandit AB. The degradation kinetics of flavor in black pepper (*Piper nigrum* L.). *J Food Eng*. 2009;92(1):44-9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.018>
- Sayılı M, Şekeroğlu N, Akça H, Yaramancı H. Ordu ili kentsel alanda tüketicilerin baharat tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. *Teknolojik Araştırmalar Dergisi*. 2006;2:1-7.
- Demircioğlu Y, Yaman M, Şimşek I. Kadınların baharat kullanım alışkanlıkları üzerine bir araştırma. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*. 2007;6(3):161-8.
- Reddy SV, Srinivas PV, Praveen B, et al. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine*. 2004;11(7-8):697-700. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.04.004>
- Narayanan CS. Chemistry of black pepper. Ravindran PN (ed): *Black Pepper* (kitabında). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000:165-84.
- Zachariah TJ. On farm processing of black pepper. Ravindran PN (ed): *Black Pepper* (kitabında). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000:345-65.
- Meghwal M, Goswami TK. *Piper nigrum* and piperine: an update. *Phytother Res*. 2013;27(8):1121-30. <https://doi.org/10.1002/ptr.4972>

21. Al-Turki AI. Antibacterial effect of thyme, peppermint, sage, black pepper and garlic hydrosols against *Bacillus subtilis* and *Salmonella enteritidis*. J Food Agric Environ. 2007;5(2):92-4.
22. Karsha PV, Lakshmi OB. Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) with special reference to its mode of action on bacteria. Indian J Nat Prod Resou. 2010;1(2):213-5.
23. Ghori I, Ahmad SS. Antibacterial activities of honey, sandal oil and black pepper. Pak J Bot. 2009;41(1):461-6.
24. Shete HG, Chitanand MP. Antimicrobial activity of some commonly used Indian spices. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014;3(8):765-70.
25. Zou L, Hu YY, Chen WX. Antibacterial mechanism and activities of black pepper chloroform extract. J Food Sci Technol. 2015;52(12):8196-203. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1914-0>
26. Zhang J, Ye KP, Zhang X, Pan DD, Sun YY, Cao JX. Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2017;7:2094. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02094>
27. Kılıç A. Uçucu yağ elde etme yöntemleri. Bartın Orman Fak Derg. 2008;10(13):37-45.
28. Sutherland J, Miles M, Hedderley D, et al. In vitro effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. Int J Food Sci Nutr. 2009;60(8):717-27. <https://doi.org/10.3109/09637480802165650>
29. Yıldırım Aybakır M. Baharatın antimikrobiyel etkisinin engeller teknolojisi kapsamında incelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi, 2015.
30. Ajiboye TO, Mohammed AO, Bello SA, et al. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. Microb Pathog. 2016;95:208-15. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.011>
31. Liu Q, Meng X, Li Y, Zhao CN, Tang GY, Li HB. Antibacterial and antifungal activities of spices. Int J Mol Sci. 2017;18(6):1283. <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>
32. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J Food Prot. 2002;65(10):1545-60. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1545>
33. Moritz CMF, Rall VLM, Saeki MJ, Júnior AF. Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. Braz J Microbiol. 2012;43(3):1147-56. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000042>
34. Si W, Gong J, Tsao R, et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. J Appl Microbiol. 2006;100(2):296-305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02789.x>
35. Morales R, Biskup ES, Sáez F. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. Stahl-Biskup E, Sáez F (eds), *Thyme: the Genus Thymus* (kitabında). CRC Press. 2002;1-43.
36. Çetin B, Cakmakci S, Gurses M. Anti-probiotic effects of essential oils from some Turkish endemic thyme species. Asian J Chem. 2013;25(15):8625-8. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.14868>
37. Baser KHC. Essential oils of *Labiatae* from Turkey: Recent results. Lamiales Newsletter. 1994;3:6-11.
38. Saeed F, Afzaal M, Tufail T, Ahmad A. Use of natural antimicrobial agents: a safe preservation approach. Var I, Uzunlu S (eds) *Active Antimicrobial Food Packaging* (kitabında), IntechOpen, 2019.
39. Uhl SR. Handbook of spices, seasonings and flavorings. Lancaster, Pa: Technomic Publishing Company, 2000.
40. Ultee A, Kets E, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microb. 1999;65(10):4606-10. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999>
41. Oliveria Lima I, Oliveira Pereira F, Oliveira WA, et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. J Essent Oil Res. 2013;25(2):138-42. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.754728>
42. Mahboubi M, Heidarytabar R, Mahdizadeh E, Hosseini H. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus* species and *Zataria multiflora* essential oils. Agric Nat Resour. 2017;51(5):395-401. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.02.001>
43. Benli M, Yiğit N. Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. Orlab On-Line Mikrobiyol Derg. 2005;3(8):1-8.
44. Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. Int J Infect Dis. 2006;10(3):236-41. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.05.006>
45. Sağdıç O, Özcan M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. Food Control. 2003;14(3):141-3. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00057-9)
46. Roldán LP, Díaz GJ, Düringer JM. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria. Rev Colomb Cienc Pec. 2010;23(4):451-61.

47. Karankı E. Ülkemizde yaygın olarak kullanılan bazı baharatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Niğde: Niğde Üniversitesi, 2013.
48. Yıldız G, Kılınç E. Rize ili kentsel alanda tüketicilerin baharat tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2010;5(2):28-34.
49. Batiha GES, Alqahtani A, Ojo OA, et al. Biological properties, bioactive constituents, and pharmacokinetics of some *Capsicum* spp. and capsaicinoids. Int J Mol Sci. 2020;21(15):5179. <https://doi.org/10.3390/ijms21155179>
50. Koffi-Nevry R, Kouassi KC, Nanga ZY, Koussémon M, Loukou GY. Antibacterial activity of two bell pepper extracts: *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens*. Int J Food Prop. 2012;15(5):961-71. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.509896>
51. Nurjanah S, Sudaryanto Z, Widhyasanti A, Pratiwi H. Antibacterial activity of *Capsicum annuum* L. oleoresin. In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): V World 2014;1125:189-94. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1125.23>
52. Casimir OA, Martin DK, Philippe EK, Augustin AA, Parfait KEJ. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Capsicum annuum* var. *annuum* concentrated extract obtained by reverse osmosis. GSC Biol Pharm Sci. 2018;5(2):116-25. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.5.2.0123>
53. Oranusi SU, Nwachukwu C, Adekeye BT, Dahunsi SO, Adeyemi, AO. Microbial profile, antibacterial and antioxidant activities of some imported spices in Nigeria. Eur J Exp Biol. 2013;3(6):93-202.
54. da Silva Pereira L, do Nascimento VV, Ribeiro SDF, et al. Characterization of *Capsicum annuum* L. leaf and root antimicrobial peptides: antimicrobial activity against phytopathogenic microorganisms. Acta Physiol Plant. 2018;40(6):1-15. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2685-9>
55. Berrocal-Lobo M, Molina A, Rodríguez-Palenzuela P, García-Olmedo F, Rivas L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. Exp Parasitol. 2009;122(3):247-9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.019>
56. Tang SS, Prodhan ZH, Biswas SK, Le CF, Sekaran SD. Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. Phytochemistry. 2018;154:94-105. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.002>
57. Aydın H. Bazı baharatların farklı ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Edirne: Trakya Üniversitesi, 2011.
58. Behera S, Nagarajan S, Rao LJM. Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. Food Chem. 2004;87(1):25-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.012>
59. El-Sawi SA, Mohamed MA. Cumin herb as a new source of essential oils and its response to foliar spray with some micro-elements. Food Chem. 2002;77(1):75-80. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00326-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00326-0)
60. Kedia A, Prakash B, Mishra PK, Dubey NK. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. Int J Food Microbiol. 2014;168-169:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.008>
61. Dua A, Gaurav G, Balkar S, Mahajan R. Antimicrobial properties of methanolic extract of cumin (*Cuminum cyminum*) seeds. Int J Res Ayurveda Pharm. 2016;4(1):104-7. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.04136>
62. Sethi S, Dutta A, Gupta BL, Gupta S. Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. Int J Pharm Pharm Sci. 2013;5(1):260-2.
63. Baljeet SY, Simmy G, Ritika Y, Roshanlal Y. Antimicrobial activity of individual and combined extracts of selected spices against some pathogenic and food spoilage microorganisms. Int Food Res J. 2015;22(6):2594-600.
64. Özcan M, Erkmén O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. Eur Food Res Technol. 2001;212(6):658-60. <https://doi.org/10.1007/s002170100310>
65. Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. Potravinarstvo. 2019;13(1):875-83. <https://doi.org/10.5219/1226>
66. Das S, Anjeza C, Mandal S. Synergistic or additive antimicrobial activities of Indian spice and herbal extracts against pathogenic, probiotic and food-spoiler micro-organisms. Int Food Res J. 2012;19(3):1185-91.
67. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. Int J Food Sci Technol. 2008;43(3):526-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01489.x>
68. Chen Y, Yu L, Qiao N, et al. *Lactobacillus curvatus*: A candidate probiotic with excellent fermentation properties and health benefits. Foods. 2020;9(10):1366. <https://doi.org/10.3390/foods9101366>

69. Won SM, Chen S, Park KW, Yoon JH. Isolation of lactic acid bacteria from kimchi and screening of *Lactobacillus sakei* ADM14 with anti-adipogenic effect and potential probiotic properties. LWT. 2020;126:109296.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109296>
70. Löfblom J, Rosenstein R, Nguyen MT, Ståhl S, Götz, F. *Staphylococcus carnosus*: from starter culture to protein engineering platform. Appl Microbiol Biotechnol. 2017;101:8293-307.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8528-6>
71. Aydın Ö. Tarçın, kimyon ve sumak adlı baharat türlerinden elde edilen su, etanol-su, metanol ve kloroform ekstraktlarının in vitro antioksidant özelliklerinin belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2011.
72. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. Nutrients. 2015;7(9):7729-48.
<https://doi.org/10.3390/nu7095359>
73. Ali SM, Khan AA, Ahmed I, et al. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2005;4:20.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-4-20>
74. Becerril R, Gómez-Lus R, Goñi P, López P, Nerín C. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. Anal Bioanal Chem. 2007;388(5-6):1003-101.
<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1332-x>
75. Kong B, Wang J, Xiong YL. Antimicrobial activity of several herb and spice extracts in culture medium and in vacuum-packaged pork. J Food Prot. 2007;70(3):641-7.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.3.641>
76. López P, Sánchez C, Batlle R, Nerín C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. J Agric Food Chem. 2007;55(11):4348-56.
<https://doi.org/10.1021/jf063295u>
77. Winward GP, Avery LM, Stephenson T, Jefferson B. Essential oils for the disinfection of grey water. Water Res. 2008;42(8-9):2260-8.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.12.004>
78. Frankova A, Marounek M, Mozrova V, Weber J, Kloucek P, Lukesova D. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(10):795-7.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1737>
79. Zhang Y, Liu X, Wang Y, Jiang P, Quek, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Food Control. 2016;59:282-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.032>
80. Cui H, Zhou H, Lin L, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil and its application in milk. J Anim Plant Sci. 2016;26(2):532-41.
81. Behrad S, Yusof MY, Goh KL, Baba AS. Manipulation of probiotics fermentation of yogurt by cinnamon and licorice: effects on yogurt formation and inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro. Int Scho Sci Res Innovation. 2009;3(12):563-7.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1085692>
82. Zaika LL, Kissinger JC. Fermentation enhancement by spices: identification of active component. J Food Sci. 1984;49(1):5-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13655.x>
83. Evren M, Tekgüler B. Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi. 2011;9(3):28-40.
84. Joe MM, Jayachitra J, Vijayapriya M. Antimicrobial activity of some common spices against certain human pathogens. J Med Plants Res. 2009;3(12):1134-6.
<https://doi.org/10.5897/JMPR.9000167>
85. Britto A, Gracelin D, Benjamin P, Kumar JR. Antibacterial potency and synergistic effects of a few South Indian spices against antibiotic resistant bacteria. Indian J Nat Prod Resour. 2012;3(4):557-62.
86. Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam SM, Samra ZQ, Athar AM. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012;11(1):8.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-8>
87. Ismail MM, Essam TM, Mohamed AF, Mourad FE. Screening for the antimicrobial activities of alcoholic and aqueous extracts of some common spices in Egypt. Int J Microbiol Res. 2012;3(3):200-7.
<https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.3.716>
88. Mishra N, Behal KK. Antimicrobial activity of some spices against selected microbes. Int J Pharm Pharm Sci. 2010;2:187-96.
89. Revati S, Bipin C, Chitra PB. In vitro antibacterial activity of seven spices against clinical isolates of Enterococci. Int J Pharm Bio Sci. 2013;3(1):298-304.

90. Shaaban HA, Ahmed MBM, Sideek LEE, Amer MM. Study on the antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils against pathogenic and food-spoiler microorganisms. *J Appl Sci Res.* 2013;9(8):5076-85.
91. Wang X, Shen Y, Thakur K, et al. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* 2020;25(17):3955. <https://doi.org/10.3390/molecules25173955>
92. Weckerle B, Michel K, Balázs B, Schreier P, Tóth G. Quercetin 3, 3', 4'-tri-O-β-D-glucopyranosides from leaves of *Eruca sativa* (Mill.). *Phytochem.* 2001;57(4):547-51. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00059-0)
93. Khoobchandani M, Ojeswi BK, Ganesh N, et al. Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extracts. *Food Chem.* 2010;120(1):217-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.011>
94. Miyazawa M, Maehara T, Kurose K. Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*. *Flavour Fragr J.* 2002;17(3):187-90. <https://doi.org/10.1002/ffj.1079>
95. Evans WC. *Trease and Evans Pharmacognosy* (14th Edition). WB Saunders Company Ltd., London, 1996:19-20.
96. Bown D. *Encyclopaedia of Herbs and Their Uses*. Dorling Kindersley, London, England, 1995.
97. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi: Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 1999.
98. Gulfraz M, Sadiq A, Tariq H, Imran M, Qureshi R, Zeenat A. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pak J Bot.* 2011;43(2):1351-9.
99. Doulgieraki AI, Efthimiou G, Paramithiotis S, Pappas KM, Typas MA, Nychas GJ. Effect of rocket (*Eruca sativa*) extract on MRSA growth and proteome: metabolic adjustments in plant-based media. *Front Microbiol.* 2017;8: 782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00782>
100. Jin J, Koroleva OA, Gibson T, et al. Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*) leafy salad following cultivation in different environments. *Agric Food Chem.* 2009;57(12):5227-34. <https://doi.org/10.1021/jf9002973>
101. Selma MV, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem.* 2009;57(15):6485-501. <https://doi.org/10.1021/jf902107d>
102. Loo YT, Howell K, Chan M, Zhang P, Ng K. Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020;19(4):1268-98. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12563>
103. Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GG, et al. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British J Nutr.* 2008;99(4):782-92. <https://doi.org/10.1017/S0007114507853384>
104. Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microb.* 2006;157(9):876-84. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.07.004>
105. Fratianni F, Pepe S, Cardinale F, et al. *Eruca sativa* might influence the growth, survival under simulated gastrointestinal conditions and some biological features of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):17790-805. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.07.004>
106. Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microb.* 2008;124(3):295-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.017>
107. Parker SG, Trower TM, Stevenson DE. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe.* 2013;23:12-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.07.009>
108. Anonim. Garlic Market. Agricultural Outlook, Economic Research Service/ USDA. 2000:7-10.
109. Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B. Onions-a global benefit to health. *Phytother Res.* 2002;16(7):603-15. <https://doi.org/10.1002/ptr.1222>
110. Sahu S, Das BK, Mishra BK, Pradhan J, Sarangi N. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Ichthyol.* 2007;23(1):80-6. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00785.x>
111. Roldán E, Sánchez-Moreno C, de Ancos B, Cano MP. Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chem.* 2008;108(3):907-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.058>
112. Lu X, Wang J, Al-Qadiri HM, et al. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chem.* 2011;129(2):637-44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.105>

113. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2004;3(1):21-33.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
114. Kyung KH, Lee YC. Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from S-alk (en) γ -L-cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica*. *Food Reviews Int.* 2001;17(2):183-98.
<https://doi.org/10.1081/FRI-100000268>
115. Corzo-Martínez M, Villamiel M. An overview on bioactivity of onion. *Onion Consumption and Health.* 1^a Ed. Nueva York: Nova Science Publishers, Inc, 2012:1-48.
116. Sharma K, Mahato N, Lee YR. Systematic study on active compounds as antibacterial and antibiofilm agent in aging onions. *J Food Drug Anal.* 2018;26(2):518-28.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.06.009>
117. Ahiabor C, Gordon A, Ayithey K, Agyare R. In vitro assessment of antibacterial activity of crude extracts of onion (*Allium cepa* L.) and shallot (*Allium aescalonicum* L.) on isolates of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Salmonella typhi* (ATCC 19430). *Int J Appl Res.* 2016;2(5):1029-32.
118. Santas J, Almajano MP, Carbó R. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *Int J Food Sci Tech.* 2010;45(2):403-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02169.x>
119. Lasik M, Gumienna M, Nowak J. Evaluation of the antibacterial properties of onion, garlic and oregano water extracts during in vitro digestion process in the model of human gastrointestinal tract. *Polish J Food Nutr Sci.* 2007;57(4B):353-7.
120. Şengün İY, Öztürk B. Bitkisel kaynaklı bazı doğal antimikrobialler. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji.* 2018;7(2):256-76.
<https://doi.org/10.18036/aubtdc.407806>
121. Sihombing DR, Herla R, Dwi S, Dera RTS, Sisilia FY. Antimicrobial effects of chive extracts against bacteria pathogen and *Lactobacillus acidophilus*. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.* 2018;205:012049.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/205/1/012049>
122. Yağcıoğlu P. Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, 2015.
123. İlisulu K. İlaç ve Baharat Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. 1992;1256:1-6.
124. Kamatou GPP, Makunga NP, Ramogola WPN, Viljoen AM. South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *J Ethnopharmacol.* 2008;119(3):664-72.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.030>
125. Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira IC. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chem.* 2015;170:378-85.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.096>
126. Li B, Zhang C, Peng L, et al. Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC-MS and HPLC methods. *Ind Crops Prod.* 2015;69:329-34.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.047>
127. Eidi A, Eidi M. Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Syndr: Clin Res Rev.* 2009;3(1):40-4.
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2008.10.007>
128. Zeybek U, Zeybek N. Farmasötik botanik kapalı tohumlu bitkiler (*Angiospermae*) sistematigi ve önemli maddeleri. *J Fac Pharm Istanbul Univ.* 2011;40:77-87.
129. Wang M, Shao Y, Huang TC, Wei GJ, Ho CT. Isolation and structural elucidation of aroma constituents bound as glycosides from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem.* 1998;46(7):2509-11.
<https://doi.org/10.1021/jf980160i>
130. Mehani M, Segni L, Terzi V, Morcia C, Mehani I. Antibacterial, antifungal activity and chemical composition study of essential oil of *Salvia officinalis* from the South Algerian. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol.* 2020;21(47-48):87-97.
131. Özkan G, Sağdıç O, Özcan M. Note: Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Sci Tech Int.* 2003;9(2):85-8.
<https://doi.org/10.1177/1082013203009002003>
132. Horiuchi K, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Tsuchiya T. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(2):287-90.
<https://doi.org/10.1248/bpb.30.287>
133. Ghorbani A, Esmaeilzadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Comp Med* 2017;7(4):433-40.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>
134. Šojić B, Ikonić P, Pavlič B, et al. The effect of essential oil from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the microbiological stability of fresh pork sausages. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.* 2017;85(1):012055.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/85/1/01205>

135. Gargacı A. Balığın raf ömrüne biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ekstaktının etkisi [Yüksek Lisans Tezi]. Sinop: Sinop Üniversitesi, 2010.
136. Mehrsorosh H, Gavanji S, Larki B, et al. Essential oil composition and antimicrobial screening of some Iranian herbal plants on *Pectobacterium carotovorum*. Global Nest J. 2014;16(2):240-50.
137. Bayrak A. Gıda aromaları. Gıda Teknolojisi Derneği. 2006;32:497.
138. Vazgeçer B, Ulu H, Öztan A. Et ve et ürünlerinde baharatın antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. Gıda. 2005;30(2):75-81.
139. Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J Food Prot. 2001;64(7):1019-24. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.7.1019>
140. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytother Res. 2007;21(10):989-94. <https://doi.org/10.1002/ptr.2179>
141. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, et al. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. Chem Biodivers. 2010;7(7):1835-40. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900301>
142. Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Braz J Microbiol. 2010;41(4):1070-8. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400027>
143. Jiang Y, Wu N, Fu YJ, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Envi Toxicology Pharma. 2011;32(1):63-8. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>
144. Sinha R, Chattopadhyay S. Changes in the leaf proteome profile of *Mentha arvensis* in response to *Alternaria alternata* infection. J Proteom. 2011;74(3):327-36. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.11.009>
145. Nascimento EMM, Rodrigues FFG, Campos AR, Costa JGM. Phytochemical prospection, toxicity and antimicrobial activity of *Mentha arvensis* (*Labiatae*) from Northeast of Brazil. J Young Pharm. 2009;1(3):210-2. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.57066>
146. Phatak SV, Heble MR. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. Fitoterapia. 2002;73(1):32-9. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00347-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00347-1)
147. Özer E. Nane (*Mentha piperita* L.)'nin farklı kısımlarına uygulanan farklı kurutma tekniklerinin uçucu yağın bileşimine ve antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi, 2012.
148. Antolak H, Czyżowska A, Kręgiel D. Activity of *Mentha piperita* L. ethanol extract against acetic acid bacteria *Asaia* spp. Foods. 2018;7(10):171. <https://doi.org/10.3390/foods7100171>
149. Jagetia GC, Baliga MS. Influence of the leaf extract of *Mentha arvensis* Linn.(mint) on the survival of mice exposed to different doses of gamma radiation. Strahlenther Onkol. 2002;178(2):91-8. <https://doi.org/10.1007/s00066-002-0841-y>
150. Ertürk Ö. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. Biologia. 2006;61(3):275-8. <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0050-8>
151. Bassolé IHN, Lamien-Meda A, Bayala B, et al. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. Molecules. 2010;15(11):7825-39. <https://doi.org/10.3390/molecules15117825>
152. Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshkumar A, Sureshkumar P, Murali K. Antibacterial activity of *Mentha piperita* L.(peppermint) from leaf extracts-a medicinal plant. Acta Agriculturae Slovenica. 2007;89(1):73-9. <https://doi.org/10.2478/v10014-007-0009-7>
153. İbret B. Türkiye'deki sarımsak tarımı ve Taşköprü sarımsağı üzerine coğrafi açıdan bir inceleme. Marmara Coğrafya Dergisi. 2013;12:17-50.
154. Akan S, Halloran N. Sarımsağın insan sağlığı açısından önemi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim, 2012, Hatay, Türkiye:181.
155. Curtis H, Noll U, Störmann J, Slusarenko AJ. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiol Mol Plant Pathol. 2004;65(2):79-89. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.11.006>
156. Artık N, Poyrazoğlu ES. Kastamonu sarımsağının bileşim unsurları ve sarımsak ürünleri üretimi üzerine araştırma. Ankara Üniv Ziraat Fak Dergisi, 1994.
157. Focke M, Feld A, Lichtenthaler HK. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. FEBS Letters. 1990;261(1):106-8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80647-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80647-2)

158. Adetumbi M, Javor GT, Lau BH. *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;30(3):499-501. <https://doi.org/10.1128/AAC.30.3.499>
159. Belguith H, Kthiri F, Ammar AB, Jaafoura H, Hamida JB, Landoulsi A. Morphological and biochemical changes of salmonella hadar exposed to aqueous garlic extract. *Int J Morphol*. 2009;27(3):705-13.
160. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microb Infect*. 1999;1(2):125-9. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80003-3)
161. Avato P, Tursi F, Vitali C, Miccolis V, Candido V. Allylsulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. *Phytomedicine*. 2000;7(3):239-43. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80010-0](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80010-0)
162. Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res Int*. 2011;44(9):3057-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>
163. Gyawali R, Ibrahim SA. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95(1):29-45. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4117-x>
164. Indu MN, Hatha AAM, Abirosh C, Harsha U, Vivekanandan G. Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz J Microbiol*. 2006;37(2):153-8. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000200011>
165. Chen C, Liu CH, Cai J, et al. Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Food Control*. 2018;86:117-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.015>
166. Rees LP, Minney SF, Plummer NT, Slater JH, Skyrme DA. A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). *World J Microbiol Biotechnol*. 1993;9(3):303-7. <https://doi.org/10.1007/BF00383068>
167. Booyens J, Thantsha MS. Antibacterial effect of hydrosoluble extracts of garlic (*Allium sativum*) against *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*. *Afr J Microbiol Res*. 2013;7(8):669-77.
168. Chen YY, Chiu HC, Wang YB. Effects of garlic extract on acid production and growth of *Streptococcus mutans*. *J Food Drug Anal*. 2009;17:59-63.
169. Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(1):475-80. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.475-480.2001>
170. Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(11):4238-42. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4238-4242.1996>

Serviks Dokularında HPV DNA Pozitifliği ve Osteopontin Düzeyi Arasındaki İlişkinin Araştırılması[§]

Investigation of the Relationship Between HPV DNA Positivity and Osteopontin Levels in Cervical Tissue

Esra Tuba Demir*, **, Merve Aydın Terzioğlu**, ***, Mehmet Kulhan****, Aytekin Çıkman****, Barış Gülhan**, Nur Gözde Kulhan****, İlyas Sayar****, Yusuf Kemal Arslan****, Cuma Mertoğlu****

* Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Anestezi Programı, Erzincan, Türkiye
** Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye
*** KTO Karatay Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye
**** Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Konya, Türkiye
***** Gözde İzmir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye
***** Konya Şehir Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Konya, Türkiye
***** Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye
***** Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye
***** Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

Atf/Cite as: Demir ET, Aydın Terzioğlu M, Kulhan M, ve ark. Serviks dokularında HPV DNA pozitifliği ve osteopontin düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 2022;52(1):30-38.

Öz

Amaç: Çalışmamızda, HPV pozitif ve HPV negatif serviks dokularında osteopontin düzeyinin araştırılması, prognostik bir biyobelirteç olarak tanıda klinik öneminin değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Haziran 2015-Nisan 2017 tarihleri arasında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran ve serviks kanseri taramasına katılan 82 kişi çalışmaya alındı. Servikovajinal sürüntü örnekleri, standart işlem prosedürüne göre toplandı. Geleneksel Pap sitolojisi için slayt hazırlanarak, standart protokollere göre boyandı ve sonuçlar 2004 Bethesda sınıflandırma sistemine göre derecelendirildi. Digene konik fırça örnekleyicisi ile serviksten örnek alındı. Tüm servikal örnekler, Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kiti ile analiz edildi. HPV DNA pozitifliği saptanan örnekler CLART kit ile genotipleme yapıldı. 41 HPV pozitif hasta ve 41 HPV negatif kontrolün doku örneklerinde osteopontin düzeyleri ELISA kiti ile araştırıldı.

Bulgular: Osteopontin düzeyleri hasta grubunda 31.55 ± 7.11 ng/ml, kontrol grubunda ise 28.81 ± 5.44 ng/ml olarak saptandı. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.048$). Osteopontin düzeyi ile yaş, doğum şekli, hastalık öyküsü, operasyon yöntemi, HPV tipi, preoperatif ve postoperatif patoloji, gravida ve parite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda, HPV pozitif 41 hastadan yalnızca 5'inde servikal intraepitelyal neoplazi saptanması çalışmamızın kısıtlayıcı yanını oluşturmaktadır. Osteopontin düzeyi, HPV pozitif hastalarda yüksek bulunmasına rağmen, daha geniş sayıda servikal intraepitelyal neoplazi olguları üzerinde yapılacak olan çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: ELISA, İnsan Papilloma Virüsü (HPV), osteopontin, serviks kanseri

ABSTRACT

Objective: This study aimed to investigate the osteopontin levels in HPV-positive and HPV-negative cervical tissues and evaluate the clinical significance of osteopontin as a prognostic biomarker.

Methods: A total of 82 individuals admitted to the outpatient clinic of Obstetrics and Gynecology Department of Erzincan Binali Yıldırım University, Mengücek Gazi Training and Research Hospital in Turkey and underwent cervical cancer screening between June 2015 and April 2017 were included in the study. Cervicovaginal swabs were collected according to the standard procedure. A slide for traditional Pap cytology was prepared and stained according to standard protocols, and the results were categorized according to the 2004 Bethesda classification system. All cervical specimens were analyzed using the Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kit. Genotyping was performed on the samples with HPV DNA positivity with the Clark kit. Osteopontin levels of 41 HPV positive patients and 41 HPV negative control were investigated in tissue samples with an ELISA kit.

Results: The osteopontin levels were found to be 31.55 ± 7.11 ng/ml and 28.81 ± 5.44 ng/ml in the study and control groups, respectively, which indicated a statistically significant difference between the groups ($p=0.048$). There was no statistically significant difference between the osteopontin level and age, delivery method, history of disease, surgical method, HPV type, preoperative and postoperative pathology, gravida and parity ($p>0.05$).

Conclusion: The detection of cervical intraepithelial neoplasia in only five of 41 HPV-positive patients constitutes a limitation for this study. Although the level of osteopontin was high in HPV-positive patients, further studies with more cervical intraepithelial neoplasia cases are required.

Keywords: ELISA, Human Papilloma Virus (HPV), osteopontin, cervical cancer

Alındığı tarih / Received:
26.03.2021 / 26.March.2021

Kabul tarihi / Accepted:
15.09.2021 / 15.September.2021

Erken çevrimiçi / First Published:
31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

E. T. Demir 0000-0003-3491-9798
M. Aydın Terzioğlu 0000-0002-1522-6083
M. Kulhan 0000-0002-5478-7510
A. Çıkman 0000-0001-9259-7091
B. Gülhan 0000-0002-2605-1282
N. G. Kulhan 0000-0002-7463-9101
İ. Sayar 0000-0002-7204-4112
Y. K. Arslan 0000-0003-1308-8569
C. Mertoğlu 0000-0003-3497-4092

✉ merve.aydin@karatay.edu.tr

[§] Bu çalışma, Doç. Dr. Merve AYDIN TERZIOĞLU'nun danışmanlığında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi'nde Tıbbi Mikrobiyoloji yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Bu araştırma, 22-24 Mart 2018 tarihleri arasında İzmir'de düzenlenen 2. Ulusal Viroloji Günleri'nde, poster bildirisi olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

İnsan papilloma virusu (HPV), Papillomaviridae ailesine ait, 7900 bp uzunluğunda dairesel çift sarmallı DNA'dan oluşan, ikozahedral kapsidli zarfsız DNA virüsüdür^(1,2). Bugüne kadar, 200'den fazla insan papilloma virüs genotipi karakterize edilmiştir⁽³⁾. Epidemiyolojik ve biyolojik verilere dayanarak, Alfapapillomavirus cinsinde yer alan 12 mukozal HPV tipi "Yüksek Riskli (HR) HPV tipleri" karsinojenik (IARC Grup 1) (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ve 59) ve diğer sekiz HPV türü (HPV26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 ve 82) ise "Muhtemelen Karsinojenik" (IARC Groups 2A ve 2B) olarak sınıflandırılmıştır⁽²⁻⁴⁾. HR HPV tipleri, başta rahim ağzı kanseri olmak üzere vajina, vulva, anus, penis ve orofaringeal kanser gibi çeşitli kanserlerin etiyolojik ajanlarıdır. HPV16 ve 18, servikal kanserlerin yaklaşık %70'inden sorumludur^(4,5). "Düşük riskli HPV tipleri" olarak sınıflandırılan 11 farklı HPV tipi ise (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) esas olarak genital siğiller ve iyi huylu servikal lezyonlarla ilişkilidir⁽⁶⁾.

Cinsel olarak aktif bireylerin çoğu, yaşamları boyunca bir noktada HPV ile karşılaşır. Çoğu HPV enfeksiyonu (~%90) asemptomatiktir ve 8 ay içinde aktif bağışıklık yanıtı ile temizlenir. HPV enfeksiyonlarının %10'u persiste kalır, enfeksiyonun onkojenik HPV tipine bağlı olması durumunda %3'ten azı epitelyal displazi veya %1'i invaziv serviks kanseri ile sonuçlanır^(3,7,8).

Rahim ağzı kanseri, 2018 yılında tüm kadın kanserlerinin %6.6'sını temsil eden tahmini 570.000 yeni olgu ve 311.000 ölüm ile kadınlarda dördüncü en sık görülen kanserdir^(9,10). Yüksek riskli insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu rahim ağzı kanserinin gelişmesi için gerekli bir faktör olarak kabul edilmiştir⁽³⁾. Bununla birlikte, yalnızca yüksek riskli HPV ile enfeksiyon, rahim ağzı kanserine progresyon için yeterli değildir. Servikal karsinogenez, konak hücre genlerinde DNA değişikliklerinin birikimi ile bağlantılı çok aşamalı bir prosestir. Bu değişiklikler, hücre döngüsü ilerlemesinin, kromozomal stabilitenin, telomer aktivasyonunun ve apoptozun kritik düzenleyicileri olan onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde hem epigenetik hem

de genetik değişiklikleri içerir. Ancak, tümörjenezis başlangıcı için HPV DNA'nın konak hücre genomuna entegrasyonu, HPV aracılı karsinogenezde anormal proliferasyona ve malign progresyona yol açan kilit bir olaydır^(6,11,12).

Osteopontin (OPN), moleküler ağırlığı yaklaşık 44 kDa olan, osteoblastlar, osteositler, T, B, NK ve NKT lenfositleri, miyeloid hücreler, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve nöronlar dâhil olmak üzere çeşitli hücreler tarafından üretilen çok fonksiyonlu bir fosfoglukoproteindir^(13,14). OPN, ilk kez 1979'da Senger ve ark. tarafından epitel hücrelerinin transformasyonunun bir belirteci (marker) olarak tanımlanmıştır^(15,16).

Osteopontin kemik ve kemik matrisinin yeniden modellenmesi, anjiyogenez, karsinogenez, inflamasyon ve otoimmünite gibi birçok fizyolojik ve patolojik olaya katılır^(13,14,17). Ek olarak, OPN hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerini düzenler. Yardımcı T hücre 1 sitokinlerine benzer şekilde çalışan OPN, hücre aracılı bir bağışık yanıtı uyarır. Ayrıca, sitokin üretimini kontrol eder ve bağışıklık sistemi içindeki gen ekspresyonunu düzenlemek için hücre içi yolları aktive edebilir. Osteopontin, yalnızca integrinler aracılığıyla hücrelerle değil, aynı zamanda hücre içi bir etkileşimi içeren CD44 aracılığıyla da iletişim kurar^(13,18-20).

Osteopontin akciğer, prostat, meme, kolorektal ve karaciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde aşırı eksprese edildiğinden ve doku yeniden modelleme, hücre göçü ve inflamasyondaki fonksiyonlarından dolayı protumorijenik ve premetastatik bir faktör olarak kabul edilmektedir^(14,21). Bununla birlikte, serviks dokusunda ve rahim ağzı kanserinde osteopontin ekspresyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır⁽²²⁻²⁵⁾. Çalışmamızda, HPV pozitif ve HPV negatif serviks dokularında OPN düzeyinin araştırılmasıyla prognostik bir biyobelirteç olarak tanıda klinik öneminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Erzincan Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (22.03.2017 tarih ve 2/02 kayıt numarası) onaylanmıştır.

Bu çalışma, Haziran 2015-Nisan 2017 tarihleri arasında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran ve serviks kanseri taramasına katılma isteğini belirten 82 kadın hasta üzerinde yapıldı. Geçmiş veya mevcut cinsel aktivite öyküsü olan, total uterus veya servikal rezeksiyon öyküsü olmayan, işlem sırasında gebe olmayan, HPV testi yapılmasını kabul eden kadınlar çalışmaya dâhil edildi. Örneklerin toplanması için yazılı bilgilendirilmiş onam doğrudan tüm hastalardan ve kontrol grubundan alındı. Tüm katılımcılardan yaş, evlilik, iş, gravidite, aile öyküsü, obstetrik öykü, önceki operasyonlar gibi sosyodemografik ve üreme özelliklerine yönelik kısa bir anket doldurmaları istendi. Anketi tamamlamak için yüz yüze görüşme yöntemi kullanıldı.

Tüm katılımcılardan servikovajinal sürüntü örnekleri, standart işlem prosedürüne göre jinekolog tarafından toplandı. Geleneksel Pap sitolojisi için bir slayt hazırlandı. Slaytlar, standart protokollere göre boyandı ve bir sitopatolog tarafından gözden geçirildi ve sonuçlar 2004 Bethesda Sınıflandırma Sistemine göre derecelendirildi. Sitolojik sınıflandırma şu şekilde yapıldı: (1) normal sınırlar içinde veya reaktif hücresel değişiklikler (normal), (2) atipik skuamöz hücreler (a) önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler (ASC-US), (b) düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (LSIL), (c) yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL).

Pap smearin toplanmasından sonra, Digene® konik fırça örnekleyicisi (Qiagen, Gaithersburg, MD, ABD) servikal os içine konarak 360° üç kez döndürüldü, çıkarıldı ve 1 ml Digene Standart Taşıma (STM) ortamı içine yerleştirildi (Qiagen, Gaithersburg, MD, ABD). Örnekler oda ısısında transfer edildi. Tüm servikal örnekler, 13 yüksek riskli HPV tipini (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68)

kalitatif saptayabilen nükleik asit hibridizasyon temelli Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kiti (Qiagen, Gaithersburg, MD, ABD) ile üretici firma önerileri doğrultusunda analiz edildi. RLU/Kesme Noktası Değeri Oranları ≥ 1 olan örnekler pozitif kabul edildi. RLU/Kesme Noktası Değeri Oranları ≥ 1 ve < 2.5 olan örnekler tekrarlandı. RLU/Kesme Noktası Değeri Oranları < 1 olan örnekler ise negatif olarak kabul edildi. Digene® HC2 High-Risk HPV DNA Kiti ile HPV DNA pozitifliği saptanan örnekler 13'ü yüksek riskli olmak üzere 35 HPV genotipini saptanan CLART kit (Genomica, SAU, İspanya) ile genotipleme yapıldı.

Herhangi bir HPV tipi pozitif olan tüm kadınlara kolposkopi, endoservikal kürtaj ve servikal biyopsi yapıldı. Biyopsi sonucunda HSIL veya daha yüksek bir lezyon saptanırsa LEEP ya da TAH-BSO yapıldı. Benign jinekolojik nedenlerle (over kisti, kronik pelvik ağrı, myom, endometriozis vb.) opere edilen, servikal lezyonu olmayan ve HPV negatif hastalardan bir kontrol grubu oluşturuldu. HPV pozitif ve negatif servikal doku örnekleri histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderildi. Biyopsi örnekleri, formaldehit ile belirlendi, parafine gömüldü ve patoloji laboratuvarında histopatoloji için hematoksilen-eozin ile boyandı. Patoloji sonuçları, servikal lezyon sınıflandırma kriterlerine göre servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 1-2-3 ve invaziv servikal kanser olarak sınıflandırıldı. Aynı zamanda HPV pozitif ve negatif servikal doku örnekleri PBS'e alınarak osteopontin düzeylerinin incelenmesi için Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderildi.

Dokular soğuk 1xPBS (pH=7.2-7.4) içinde yıkandı. Homojenizasyondan önce tartılarak küçük parçalara ayrıldı. Soğuk 1xPBS (pH=7.2-7.4) içinde homojenize edildikten sonra dondurma-çözdürme döngülerine tabi tutuldu. Homojenatlar 5000xg'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alıkotlandı ve ELISA testi yapılabilecek kadar -20°C'de saklandı.

Doku osteopontin düzeyleri, insan Osteopontin ELISA kiti (Hangzhou Eastbiopharm Co. Ltd, Çin) ile üretici firma önerileri doğrultusunda araştırıldı. Kit içerisinde bulunan standart sulandırılarak,

3-96 ng/ml aralığında hazırlandı. Standartların ve örneklerin absorbanları Epoch spektrofotometre (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, ABD) kullanılarak 450 nm dalga boyunda (540 nm veya 570 nm düzeltme) okutuldu. Osteopontin düzeyini belirlemek için standart eğri x ekseninde standart konsantrasyon ve y ekseninde absorban olacak şekilde oluşturuldu. Her örnek çift çalışıldı.

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS 19 (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp) kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma ve medyan (maksimum-minimum), kategorik değişkenler ise n (%) olarak belirtildi. Çok düşük n'e sahip bazı durumlarda (n<3) p değeri sunulamadı. İki grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarının sağlandığı durumda "Student's t Test", sağlanmadığında ise "Mann Whitney-U testi" kullanıldı. Üç veya daha fazla grup karşılaştırması yapılırken Tek Yönlü Varyans Analizi, parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Kruskal Wallis testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 41 (%50) HPV pozitif hasta ve 41 (%50) HPV negatif sağlıklı kontrol olmak üzere 82 kişi dâhil edildi. HPV pozitif hastaların yaş ortalaması 43.88±9.2, HPV negatif kontrollerin ise 49.63±10.3 olarak bulundu. Hasta grubunda, 35 yaş üzeri için OPN değeri ortalaması 31.5±7.2 iken, 35 yaş ve altı için 31.8±6.4 idi. Kontrol grubunda 35 yaş ve üzeri için OPN değeri ortalaması 28.8±5.6 iken, 35 yaş ve altı için 28.2±3.8 idi. Hasta ve kontrol gruplarında 35 yaş ve üzeri ve 35 yaş altı OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulundu (sırasıyla p=0.282, p=0.095) (Tablo 2).

Osteopontin düzeyleri HPV pozitif hasta grubunda 31.6±7.1 ng/ml, HPV negatif kontrol grubunda ise 28.8±5.4 ng/ml olarak saptandı. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (p=0.048) (Tablo 1).

HPV pozitif 41 hastanın 28'inde (%68.3) yüksek riskli HPV tipi saptanırken, 13'ünde (%31.7) ise diğer HPV tipleri saptandı. Yirmi sekiz hastanın 18'inde (%64.3) HPV-16, ikisinde (%7.1) HPV-18, ikisinde (%7.1) HPV-33, birinde (%3.6) HPV-39, birinde (%3.6) HPV-45, üçünde (%10.7) HPV-51 ve birinde (%3.6) ise HPV-52 saptandı.

Yüksek riskli HPV saptanan hastalarda OPN değeri ortalaması 32.4±7.7 bulunurken, diğer HPV tipi pozitifliği saptananlarda ise 29.5±5.2 olarak bulundu. HPV tipi ile OPN değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.220) (Tablo 1).

Ev hanımı ve çalışanlar arasında OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulundu (p=0.950) (Tablo 1). HPV pozitif hasta ve kontrol gruplarında ev hanımlarının OPN ortalama değeri istatistiksel olarak benzer bulunurken (p=0.274), çalışanların OPN ortalama değeri ise istatistiksel olarak farklı bulundu (p=0.029) (Tablo 2).

Hasta grubunun tamamı doğum yapmışken, kontrol grubunda ise bir kişi doğum yapmamıştır. Doğum yapan 81 kişiden 62'si normal doğum (%76.5), 19'u (%23.5) ise sezaryen doğum yapmıştır. Normal ve sezaryen doğum arasında OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (p=0.371) (Tablo 1). HPV pozitif hasta grubunda normal doğum yapanların OPN değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek olup, fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.044). HPV pozitif hasta ve kontrol grubunda sezaryen doğum yapanların OPN değerleri ise benzerdir (Tablo 2).

Operasyon yöntemi olarak 38 kişiye (%46.3) "Total Abdominal Histerektomi Bilateral Salpingo-Ooferektomi" (TAH-BSO), yedi kişiye (%8.5) "Loop Electrosurgical Excision Procedure" (LEEP), 37 kişiye (%45.1) servikal biyopsi uygulanmıştır. Operasyon yöntemleri arasında OPN değerleri istatistiksel olarak benzerdir (p=0.443) (Tablo 1).

TAH-BSO yöntemi ve servikal biyopsi uygulanan hasta ve kontrol gruplarında OPN değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (sırasıyla

p=0.092, p=0.825). LEEP-kontrol grubunda ise bir kişi olduğundan istatistiksel test uygulanamamıştır (Tablo 2).

HPV pozitif hasta ve kontrol grubunda, 67 kişi üç ve üzeri, 14 kişi ise üçün altında gebelik yaşamıştır. Gravida sayısı OPN değerlerini etkilememiştir (p=0.155) (Tablo 1).

Hasta grubunda 34 kişi üç ve üzeri, yedi kişi ise üçün altında gebelik yaşamıştır. Kontrol grubunda ise 33 kişi üç ve üzeri, yedi kişi üçün altında gebelik yaşamıştır. Üç ve üzeri gebelik yaşayan HPV pozitif

hasta grubunda OPN değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur, ancak istatistiksel olarak benzerdir (p=0.082). Üçün altında gebelik yaşayan HPV pozitif hasta grubunda ve kontrol grubunda ise OPN değerleri benzer bulunmuştur (p=0.498).

HPV pozitif hasta ve kontrol grubunda, 81 kişiden 57'sinin üç ve üzerinde doğumla sonlanan gebeliği olurken, ikisinin ise üçün altında doğumla sonlanan gebeliği olmuştur. Parite sayısı OPN değerlerini etkilememiştir (p=0.460) (Tablo 1). Üç ve üzeri doğumla sonlanan gebelik yaşayanlarda HPV pozitif hastalarda OPN değerleri kontrol grubuna göre daha

Tablo 1. Osteopontin ölçümüne ait tanımlayıcı istatistikler

		n	Ort±Std. Sapma	Medyan (Min.-Maks.)	P
HPV	Pozitif	41	31.6±7.1	31.4 (14.3-49.7)	0.048
	Negatif	41	28.8±5.4	29.4 (16.8-39.6)	
HPV tipi	Yüksek Risk	28	32.4± 7.7	33.3 (14.2-49.7)	0.220
	Diğer	13	29.5±5.2	28.8(22.6-39.7)	
Çalışma durumu	Ev hanımı	74	30.3±6.2	29.8 (14.3-49.7)	0.950
	Çalışan	8	29.4±8.7	30.3 (16.8-41.0)	
Doğum Şekli	Normal	62	30.5±6.4	29.9 (14.3-49.7)	0.371
	Sezaryen	19	29.1±6.6	29.4 (16.8-42.7)	
Operasyon Yöntemi	TAH-BSO	38	29.3±6.4	29.4 (16.8-49.7)	0.443
	LEEP	7	31.7±5.6	32.2 (23.4-40.0)	
	Servikal Biyopsi	37	30.8±6.6	30.5 (14.3-44.1)	
Operasyon Öncesi Patoloji	Normal	36	32.1±7.3	32.5 (14.2-49.7)	*
	Enfeksiyon	1	27.28±0	27.2 (27.2-27.2)	
	ASCUS	2	30.3±3.5	30.3 (27.7-32.8)	
	LGSIL	2	24.9±1.7	24.9 (23.6-26.1)	
Operasyon Sonrası Patoloji	Normal	36	32.0±7.2	32.5 (14.2-49.7)	*
	CIN 1	2	29.2±7.9	29.2 (23.6-34.8)	
	CIN 2	2	29.4±2.3	29.4 (27.7-31.0)	
	CIN 3	1	23.4±0	23.4 (23.4-23.4)	
Gravida	≥3	67	29.8±6.5	29.5 (14.3-49.7)	0.155
	<3	14	32.5±6.0	32.4 (22.6-42.7)	
Parite	≥3	57	29.9±6.5	29.6 (14.3-49.7)	0.460
	<3	24	31.1±6.4	31.5 (18.6-42.7)	

*Kişi sayısı az olan durumlarda istatistiksel test uygulanamadığı için p değeri sunulamamıştır.

HPV: İnsan Papilloma Virusu, TAH-BSO: Total Abdominal Histerektomi Bilateral Salpingo-ooferektomi, LEEP: Loop Electrosurgical Excision Procedure, CIN: Servikal İntraepitelyal Neoplazi, ASCUS: Önemi Belirlenemeyen Atipik Skuamöz Hücreler, LSIL: Düşük Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyon.

Tablo 2. Demografik ve klinik karakteristiklere göre çalışma gruplarında osteopontin değerleri

		Grup	n	Ort±Std. Sapma	Medyan (Min.-Maks.)	p
Yaş	≤35	HPV pozitif	9	31.8 ± 6.4	34.3 (23.6-44.1)	0.282
		HPV negatif	3	28.2 ± 3.8	26.3 (25.7-32.6)	
	>35	HPV pozitif	32	31.5 ± 7.2	31.3 (16.1-49.7)	
		HPV negatif	38	28.8 ± 5.6	29.4 (16.8-39.6)	
Çalışma Durumu	Ev hanımı	HPV pozitif	37	31.0 ± 7.2	31.3 (14.2-49.7)	0.274
		HPV negatif	37	29.4 ± 5.0	29.4 (18.4-39.6)	
	Çalışan	HPV pozitif	4	36.1±4.3	36.2 (31.0-40.9)	0.029
		HPV negatif	4	22.7 ± 6.1	22.3 (16.7-29.5)	
Doğum Şekli	Normal doğum	HPV pozitif	33	32.1 ± 7.1	32.2 (14.2-49.7)	0.044
		HPV negatif	29	28.8 ± 5.1	29.3 (18.4-39.6)	
	Sezaryen	HPV pozitif	8	29.2 ± 6.9	26.9(22.5-42.6)	
		HPV negatif	11	29.0 ± 6.6	30.5 (16.8-38.0)	
Operasyon Yöntemi	TAH-BSO	HPV pozitif	4	36.2 ± 9.6	34.0 (27.1-49.7)	0.092
		HPV negatif	34	28.4 ± 5.6	29.1 (16.8-38.4)	
	LEEP	HPV pozitif	6	32.0 ± 6.0	33.4 (23.4-39.9)	*
		HPV negatif	1	30.2 ± 0	30.2 (30.2-30.2)	
	Servikal Biyopsi	HPV pozitif	31	30.8 ± 6.9	31.0 (14.2-44.1)	0.825
		HPV negatif	6	30.7 ± 5.1	29.9 (25.7-39.6)	
Gravida	≥3	HPV pozitif	34	31.1 ± 7.2	31.1 (14.2-49.7)	0.082
		HPV negatif	33	28.3 ± 5.4	29.4 (16.7-38.4)	
	<3	HPV pozitif	7	33.6 ± 6.4	33.4 (22.5-42.6)	
		HPV negatif	7	31.3 ± 5.7	30.7 (25.4-39.6)	
Parite	≥3	HPV pozitif	26	31.9 ± 7.2	31.3 (14.2-49.7)	0.025
		HPV negatif	31	28.1 ± 5.4	29.4 (16.7-38.4)	
	<3	HPV pozitif	15	30.8 ± 7.2	32.2 (18.6-42.6)	0.804
		HPV negatif	9	31.5 ± 5.1	30.7 (25.4-39.6)	

*Kişi sayısı az olan durumlarda istatistiksel test uygulanmadığı için p değeri sunulamamıştır.

HPV: İnsan Papilloma Virusü, TAH-BSO: Total Abdominal Histerektomi Bilateral Salpingo-ooferektomi, LEEP: Loop Electrosurgical Excision Procedure.

yüksek bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.025). HPV pozitif hasta ve kontrol gurunda üçün altında doğumla sonlanan gebelik yaşayanlarda ise OPN değerleri benzerdir (p=0.804) (Tablo 2).

HPV pozitif hasta grubunda operasyon öncesi patoloji araştırıldığında, 36 kişide (%87.8) hücresel değişiklik saptanmazken (normal), beş kişi de ise patoloji (%12.2) belirlenmiştir. Beş kişinin ikisinde (%4.9) ASCUS, ikisinde (%4.9) LGSIL ve birinde (%2.4)

ise enfeksiyon görülmüştür. Patoloji sonucu normal olanlarda OPN değeri ortalaması 32.1±7.3, ASCUS görülenlerde 30.3±3.5, LGSIL görülenlerde 24.9±1.7, enfeksiyonda ise 27.28±0 bulunmuştur. Sayı az olduğundan p değeri verilememiştir (Tablo 1).

Operasyon sonrası patoloji araştırıldığında ise 36 kişi (%87.8) normal, beş kişide (%12.2) ise patoloji görülmüştür. Bu beş kişiden iki kişide (%4.9) CIN-1, iki kişide (%4.9) CIN-2, bir kişide ise CIN-3 saptanmıştır. Patoloji sonucu normal olan HPV pozitif hastalarda

OPN değeri ortalaması 32.0 ± 7.2 , CIN-1 görülenlerde 29.2 ± 7.9 , CIN-2 görülenlerde 29.4 ± 2.3 , CIN-3 görülenlerde 23.4 ± 0 'dır. Sayı az olduğundan p değeri verilememiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

HPV ile ilişkili olan serviks kanseri kadınlarda en sık görülen kanserler arasında olup, erken tanı yaşamsal önem taşımaktadır⁽²⁶⁾. Teşhis geciktiğinden dolayı olguların %80'i invazyon ve metastaz nedeniyle yaşamını kaybetmektedir⁽²⁵⁾. Erken teşhisle ölümler azaltılabilmektedir ve bu amaçla hastalığın erken tanısı ile prognoz için yeni belirteçlere de gereksinim duyulmaktadır^(27,28). Çalışmamızda kullandığımız OPN'de bunlardan biri olup, prostat, kolon, mide, karaciğer ve akciğer kanserleri gibi birçok kanserde ekspresyonu gösterilmiştir⁽²⁹⁾. Serviks kanseri ve OPN ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma vardır^(16,22-25,30).

Huang ve ark.⁽¹⁶⁾, çalışmalarında, OPN'in anormal ekspresyonunun servikal kanserli hastalarda radyasyon direncini ve kötü prognozu gösterdiğini bildirmişlerdir. Leung ve ark.⁽³⁰⁾, OPN fragmanlarının tanısız veya prognostik bir biyobelirteçten daha önemli olabileceğini kanserin biyolojisini çok iyi belirleyebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında, serviks kanseri tanısı almış 33 hastanın preoperatif plazma ve serum örnekleri ile sağlıklı bireylere ait 31 plazma ve 32 serum örneğinde OPN varlığını araştırmışlar ve hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek OPN düzeyleri saptamışlardır. Yine aynı kontrol grubuyla 147 servikal kanser hastasını içeren (40'ı evre I, 55'i Evre II, 52'si evre III-IV) daha büyük bir grubun plazma örneklerindeki OPN düzeylerini karşılaştırmışlar ve benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Hatta evre III-IV hastalarda OPN düzeyinin en yüksek, evre I'de ise en düşük düzeyde bulunduğunu bildirmiş, sonuç olarak OPN seviyelerinin bir biyobelirtecin ötesinde kanserin biyolojisine de ışık tutacak bir marker olduğunu belirtmişlerdir.

Sakaguchi ve ark.⁽²²⁾ yaptıkları çalışmada, servikal kanserli hastaların metastatik lenf nodlarında OPN ekspresyonunun primer tümörden daha fazla

olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca OPN seviyeleri ile prognoz arasında bir ilişki saptamışlar, OPN artışı olmayan hastaların sağ kalım oranlarının daha yüksek olduğunu bildirerek OPN düzeyinin prognostik bir gösterge olduğunu vurgulamışlardır.

Cho ve ark.⁽²³⁾ çalışmalarında, yaşa, tümör boyutuna ve tümör evresine göre OPN ekspresyonunda önemli bir fark olmadığını, yüksek ekspresyonun genel sağ kalım ($p=0.002$) ve hastalısız sağ kalım ($p=0.033$) ile anlamlı şekilde korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Rahim ağzı kanseri olan kadınlarda plazma OPN seviyelerinin in situ karsinomlu kadınlardan ve sağlıklı kontrollerden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır ($p<0.001$). Serviks kanseri hastalarında, OPN seviyelerinin artan tümör boyutu ($p=0.008$) ve tümör evresi ($p<0.001$) ile korelasyon gösterdiğini belirlemişler, OPN'nin rahim ağzı kanserini saptamadaki duyarlılığını ve özgüllüğünü sırasıyla %50.6 ve %95 olarak bulmuşlardır. Diğer çalışmaların aksine yüksek plazma OPN seviyelerinin hastalısız sağkalım ile korelasyon gösterdiğini bulmuşlar, plazma OPN seviyelerinin servikal kanser için tanısız ve prognostik bir biyobelirteç olarak yararlı olduğunu göstermişlerdir.

Song ve ark.⁽²⁴⁾, normal, karsinoma in situ ve servikal kanser dokularında osteopontin ekspresyonunu sırasıyla %2.9, %78.2 ve %88.4 olarak bulmuşlardır ($p<0.01$). Osteopontinin in situ karsinom ve invaziv servikal kanser dokularında normal servikal dokuya göre daha yüksek oranda ekspresyon edildiğini belirtmişlerdir. Osteopontin ekspresyonunun, karsinogenez ve servikal kanser invazyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermişler, osteopontinin servikal kanserin tanısında yararlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Çalışmamıza benzer bir şekilde insan papilloma virüsünün saptanması ve serviks kanseri örneklerinde osteopontin ekspresyonunu araştıran Bao ve ark.⁽²⁵⁾, OPN'nin HPV-pozitif servikal tümör dokularında HPV-negatif olanlara göre daha yüksek ekspresyon oranına sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. OPN ekspresyonunun HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu ve OPN'nin, HPV enfeksiyonunun tümör metastazı üzerindeki arttırıcı etkileri olabileceğini

belirtmişler, ayrıca serviks kanseri hastaları için radikal HPV tedavisinin, tümör hücrelerinin metastazını geciktirebileceğini ve hayatta kalmalarını uzatabileceğini vurgulamışlardır.

HPV pozitif 41 hastanın 28'inde (%68.3) yüksek riskli HPV tipi saptanırken 13'ünde (%31.7) ise diğer HPV tipleri saptandı. Yüksek riskli HPV tipi içerenlerin OPN değeri ortalaması diğer HPV tipi pozitifliği saptananlardan daha yüksek bulunmuş olup, sonuçlarımız, Bao ve ark.'nın⁽²⁵⁾ çalışmasıyla benzerdir. Hasta ve kontrol grupları arasındaki OPN değerleri kıyaslandığında HPV pozitif hasta grubu HPV negatif kontrol grubuna göre daha yüksek OPN değerine sahip bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arası OPN değerleri istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.048$) bulunmuş olup, daha önceki çalışmalarda belirtilen HPV pozitifliği ve OPN düzeyi arasındaki doğru orantılı ilişkiyi desteklemektedir.

Örneklem büyüklüğünün az olması ve HPV pozitif 41 hastadan yalnızca 5'inde CIN saptanması çalışmamızın kısıtlayıcı yanını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma yalnızca daha yüksek OPN düzeyi ile HPV enfeksiyonu arasında bir ilişki bulmuştur. Bu ilişkinin nedensel olduğunu hatta olabileceğini söylemek için yeterli değildir. Bu nedenle, OPN'nin tanısız, prognostik ve tarama programlarını destekleyici bir biyobelirteç olarak gerçek klinik değerini belirlemek için daha büyük örneklem grupları ile evre 1-3 CIN, evre 1-4 serviks kanseri gibi farklı derecede hastalığa sahip gruplarda yapılacak olan daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Erzincan Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (22.03.2017 tarih ve 2/02 kayıt numarası) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Erzincan University, Clinical Research Ethics Committee (03.22.2017; 2/02).

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

KAYNAKLAR

1. Boda D, Docea AO, Calina D, et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). *Int J Oncol.* 2018;52(3):637-55. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4256>
2. Gheit T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Front Oncol.* 2019;9:355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>
3. Kiwerska K, Jozefiak A, Markowska J, Kedzia W, Jackowska J, Wierzbicka M. Oral-genital human papillomavirus infection in Polish couples: frequent detection of HPV 42. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):122. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3645-0>
4. Kim YT, Serrano B, Lee JK, et al. Burden of Human papillomavirus (HPV)-related disease and potential impact of HPV vaccines in the Republic of Korea. *Papillomavirus Res.* 2019;7:26-42. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2018.12.002>
5. de Sanjosé S, Serrano B, Tous S, et al. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-related cancers attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectr.* 2019;2(4):pky045. <https://doi.org/10.1093/jncics/pky045>
6. Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol.* 2017;40(2):80-5.
7. Harder T, Wichmann O, Klug SJ, van der Sande MAB, Wiese-Posselt M. Efficacy, effectiveness and safety of vaccination against human papillomavirus in males: a systematic review. *BMC Med.* 2018;16(1):110. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1098-3>
8. Jeannot E, Viviano M, Follonier MC, et al. Human Papillomavirus infection and vaccination: Knowledge, attitude and perception among undergraduate men and women healthcare university students in Switzerland. *Vaccines (Basel).* 2019;7(4):130. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040130>
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
10. Hao S, Wang C, Liu S, He J, Jiang Y. HPV genotypic spectrum in Jilin province, China, where non-vaccine-covered HPV53 and 51 are prevalent, exhibits a bimodal age-specific pattern. *PLoS One.* 2020;15(3):e0230640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230640>

11. Wilting SM, Steenbergen RDM. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia. *Papillomavirus Res.* 2016;2:85-8. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2016.04.003>
12. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(7):384. <https://doi.org/10.3390/medicina55070384>
13. Zhao H, Chen Q, Alam A, et al. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):356. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0391-6>
14. Shurin MR. Osteopontin controls immunosuppression in the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2018;128(12):5209-12. <https://doi.org/10.1172/JCI124918>
15. Han X, Wang W, He J, Jiang L, Li X. Osteopontin as a biomarker for osteosarcoma therapy and prognosis. *Oncol Lett.* 2019;17(3):2592-8. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9905>
16. Huang X, Qian Y, Wu H, et al. Aberrant expression of osteopontin and E-cadherin indicates radiation resistance and poor prognosis for patients with cervical carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2015;63(2):88-98. <https://doi.org/10.1369/0022155414561329>
17. Moorman HR, Poschel D, Klement JD, Lu C, Redd PS, Liu K. Osteopontin: A key regulator of tumor progression and immunomodulation. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3379. <https://doi.org/10.3390/cancers12113379>
18. Kaleta B. Osteopontin and transplantation: Where are we now?. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2021;69(1):15. <https://doi.org/10.1007/s00005-021-00617-6>
19. Clemente N, Raineri D, Cappellano G, et al. Osteopontin bridging innate and adaptive immunity in autoimmune diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016:7675437. <https://doi.org/10.1155/2016/7675437>
20. Wei R, Wong JPC, Kwok HF. Osteopontin -- a promising biomarker for cancer therapy. *J Cancer.* 2017;8(12):2173-83. <https://doi.org/10.7150/jca.20480>
21. Castello LM, Raineri D, Salmi L, et al. Osteopontin at the crossroads of inflammation and tumor progression. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:4049098. <https://doi.org/10.1155/2017/4049098>
22. Sakaguchi H, Fujimoto J, Hong BL, Tamaya T. Clinical implications of osteopontin in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Lett.* 2007;247(1):98-102. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.03.026>
23. Cho H, Hong SW, Oh YJ, et al. Clinical significance of osteopontin expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(8):909-17. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0351-5>
24. Song JY, Lee JK, Lee NW, Yeom BW, Kim SH, Lee KW. Osteopontin expression correlates with invasiveness in cervical cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2009;49(4):434-8. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2009.01027.x>
25. Bao L, Si Q, Jia L, Ren X, Ma R, Wang Y. Detection of human papillomavirus and expression of osteopontin in cervical cancer specimens. *Mol Med Rep.* 2011;11(1):447-53. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2647>
26. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2020;40(5):602-8. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>
27. Panda J, Das A, Panigrahi A. Delays in diagnosis of cervical cancer among women attending tertiary care cancer diagnostic hospitals in Bhubaneswar, India. *Indian J Gynecol Oncol.* 2020;18:10. <https://doi.org/10.1007/s40944-019-0358-2>
28. Molina MA, Carosi Diatricch L, Castany Quintana M, Melchers WJ, Andralojc KM. Cervical cancer risk profiling: molecular biomarkers predicting the outcome of hrHPV infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(11):1099-120. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1835472>
29. Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang WG. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *Int J Mol Med.* 2017;39(6):1327-37. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2964>
30. Leung DT, Lim PL, Cheung TH, et al. Osteopontin fragments with intact thrombin-sensitive site circulate in cervical cancer patients. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160412>

COVID-19 Pandemisi Öncesi ve Sırasında Yoğun Bakım Ünitesi Hastalarından Alınan Kan Kültürü İzolatlarının Tür Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Karşılaştırılması[§]

A Comparison of the Species Distribution and Antibiotic Susceptibility Profiles of Blood Culture Isolates from Intensive Care Unit Patients Before and During COVID-19 Pandemic

Özlem Aytaç^{*@}, Feray Ferda Şenol^{*@}, Arzu Şenol^{**@}, Pınar Öner^{*@}, Zülal Aşçı Toraman^{***@}

* Elâzığ Fethi Sekin Şehir Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Elâzığ, Türkiye

** Elâzığ Fethi Sekin Şehir Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, Elâzığ, Türkiye

*** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elâzığ, Türkiye

Atıf/Cite as: Aytaç Ö, Şenol FF, Şenol A, Öner P, Aşçı Toraman Z. COVID-19 pandemisi öncesi ve sırasında yoğun bakım ünitesi hastalarından alınan kan kültürü izolatlarının tür dağılımı ve antibiyotik duyarlılık profillerinin karşılaştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):39-47.

Öz

Amaç: Çalışmamızda, 1 Mart 2019 – 29 Şubat 2020 tarihleri pandemi öncesi (PÖ) ve 1 Mart 2020-1 Mart 2021 pandemi döneminde (PD) Elâzığ Fethi Sekin Şehir Hastanesi, Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'nden laboratuvarımıza gönderilen kan kültürü örneklerinin sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. Bu dönemlerde hastanemiz yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ile antibiyotik duyarlılıklarını karşılaştırmak ve iki dönem arasında mikroorganizma dağılımı ve antibiyotik duyarlılığındaki değişimi tespit etmek amaçlanmıştır.

Yöntem: Laboratuvarımıza gelen kan kültürü şişeleri BACTEC 9120 (Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, ABD) otomasyon sistemi ile takip edilmiştir. Kan kültürü şişelerinden "pozitif uyarı" verenler, mikroorganizmaların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının tespiti için otomatize Vitek version 2.0 (BioMérieux, Fransa) ile çalışılmıştır. Kolistin direnci sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır.

Bulgular: COVID-19 öncesi dönemde laboratuvarımıza toplam 1.374 kan kültürü örneği gelmiştir ve 163 (%11.9)'ünde üreme olmuştur. PD'nde ise toplam 847 kan kültürü örneği gelmiştir. Bunlardan 148 (%17.5)'inde üreme olmuştur. PÖ'sinde ilk sırada koagülaz negatif stafillokok (KNS) (%40.5), Klebsiella spp. (%13.1), Staphylococcus aureus (%13.5); PD'inde ise KNS (%50.7), Candida spp. (%10.1), Acinetobacter spp (%9.5) saptanmıştır. İki dönem arasında Klebsiella spp, S. aureus, KNS ve mayaların üreme oranlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). PD'nde Escherichia coli'nin genel olarak antibiyotik duyarlılıklarının arttığı, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz pozitiflik oranının ise azaldığı görülmüştür. Klebsiella spp.'de ve Acinetobacter spp.'de özellikle imipenem duyarlılığının PD'nde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldığı belirlenmiştir.

Sonuç: Hastanede yatış süresinin uzaması ve COVID-19 tedavisinde yüksek düzey steroid kullanımına bağlı hastanemiz yoğun bakım hastalarında kandideminin arttığı düşünülmüştür. Candida enfeksiyonları için erken teşhis ve izleme, şiddetli COVID-19 fungal koenfeksiyonu olan hastalarda COVID-19'dan ölümleri azaltmada önemli rol oynayacaktır. Klebsiella spp.ve Acinetobacter spp.'de karbapenem direncinin COVID-19 PD'nde arttığı belirlendiğinden karbapenem ile ampirik tedaviye başlamak gerektiğinde bu durum göz önünde tutularak ampirik tedavi için kombine tedavi seçenekleri değerlendirilebilir. Acinetobacter spp. PD'nde karbapeneme duyarlı suş olmaması klonal bir direnç olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Kan kültürü, COVID-19, antibiyotik duyarlılığı, Candida

ABSTRACT

Objective: The results of the blood culture samples delivered to our laboratory from intensive care units at Elâzığ Fethi Sekin City Hospital before pandemic (March 01, 2019 and February 29, 2020) and during pandemic (March 1, 2020-March 01, 2021) were analyzed retrospectively. The aim of this study was to compare the microorganisms grown in blood cultures and the antibiotic sensitivity of bacteria of patients in intensive care units of our hospital before and during the pandemic, and to determine whether there was any difference in the distribution of microorganisms and antibiotic sensitivity between the two periods.

Methods: The blood culture bottles were tracked by using the BACTEC 9120 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, U.S.A.). For positive blood cultures, Vitek 2 (BioMérieux, France) was used to identify the grown microorganisms and determination of antibiotic sensitivity. Broth microdilution method was utilized for determination of susceptibility to colistin.

Alındığı tarih / Received:

21.05.2021 / 21.May.2021

Kabul tarihi / Accepted:

20.09.2021 / 20.September.2021

Erken çevrimiçi / First Published:

31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

Ö. Aytaç 0000-0002-3305-6284

F. F. Şenol 0000-0003-4705-5757

A. Şenol 0000-0002-8537-0195

P. Öner 0000-0001-9592-5986

Z. Aşçı Toraman 0000-0001-5202-8564

✉ ozlemozlem5@hotmail.com

[§] Bu çalışma, 8. Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırmaları Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur.

Results: A total of 1374 blood culture samples were delivered to our laboratory before COVID-19 pandemic and growth was detected in 163 (11.9%) samples. During the COVID-19 pandemic, a total of 847 blood culture samples were delivered. There was growth in 148 (17.5%) of these samples. Coagulase-negative staphylococcus (CNS) (40.5%), *Klebsiella* spp. (14.1%), and *Staphylococcus aureus* (13.5%) were the most frequently isolated microorganisms before the pandemic. CNS (50.7%), *Candida* spp. (10.1%), and *Acinetobacter* spp. (9.5%) were the most common microorganism. A statistically significant difference was detected between two periods in terms of growth of *Klebsiella* spp., *S. aureus*, CNS and fungi ($p<0.05$). Antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* was elevated, and the positivity of extended spectrum beta-lactamase decreased during the pandemic. Moreover, although not statistically significant, it was detected that particularly imipenem sensitivity decreased in *Klebsiella* spp. and *Acinetobacter* spp., during the pandemic period.

Conclusion: It was considered that candidemia was elevated in patients at intensive care unit of our hospital as a result of the prolonged hospitalization and the use of high doses of steroids for COVID-19 treatment. Early detection and surveillance for *Candida* infections would be critical in reducing COVID-19 deaths in cases of fungal co-infection in COVID-19 patients. Since carbapenem resistance was found to be elevated in *Klebsiella* spp. and *Acinetobacter* spp. during the COVID-19 pandemic, combined treatment options should be assessed if empirical treatment with carbapenem was required. Clonal evolution of carbapenem-resistance mechanisms was considered for *Acinetobacter* spp.

Keywords: Blood culture, COVID-19, Antibiotic sensitivity, *Candida*

GİRİŞ

Hastane ortamı içinde en fazla antibiyotik kullanılan aynı zamanda antibiyotik direncinin ortaya çıkması ve yayılmasında en çok sorumlu tutulan ortamlar Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ)'dir. YBÜ'lerinde yıllara göre bakteriyemiye neden olan mikroorganizmaların çeşitleri ve antibiyotik duyarlılıkları değişebilmektedir. Ampirik tedaviye yol gösterici olması açısından, bakteriyemilere neden olan etken mikroorganizmanın dağılımının ve antibiyotiklere duyarlılıklarının merkezler tarafından düzenli olarak saptanması, daha gerçekçi antibiyotik uygulama planının yapılması ve daha az direnç saptanması için önemlidir⁽¹⁾.

Antimikrobiyal tedavi ve yoğun bakım koşullarındaki ilerlemelere rağmen, sepsis yüksek mortalite ve morbidite oranlarıyla seyretmektedir⁽²⁾. Kan kültürü mikrobiyolojinin önemli ve sık kullanılan testidir. Sepsise bağlı mortalite ve morbiditenin yüksek olması nedeniyle hızlı ve doğru tanı hastanın tedavisi açısından çok önemlidir. Yaşayan canlı mikroorganizmaların hastanın kan dolaşımında varlığı, sepsis tanısı ve prognoz açısından önemli bir yere sahiptir⁽³⁾.

Aralık 2019 tarihinde Wuhan kentinde etiyojisi bilinmeyen pnömoni olgularının bildirilmesi ile yapılan araştırmalar sonucu Ocak 2020 tarihinde yeni bir koronavirüs saptanmıştır. SARS virüsüne benzerliği nedeni ile "severe acute respiratory syndrome coronavirus-2" (SARS-CoV-2) olarak isimlendirilmiştir ve Dünya Sağlık Örgütü bu virüs için 11 Mart 2020'de "pandemi" ilanı yapmıştır⁽⁴⁾.

COVID-19 enfeksiyonuna bağlı YBÜ'sinde yatış süresinin uzaması ve tedavi için çeşitli ilaçların özellikle de yüksek düzey steroidlerin kullanılması, YBÜ'lerinde sekonder enfeksiyonlara neden olabilecek mikroorganizmaların dağılımının ve antibiyotik duyarlılıklarının değişebileceğini düşündürmüştür. Bu kapsamda çalışmamızda, pandemi öncesinde ki (PÖ) YBÜ'lerinden ve pandemi dönemindeki (PD) COVID-19 YBÜ'lerinden gelen kan kültürü örneklerinde üreyen mikroorganizmaları ve antibiyotik duyarlılıklarını karşılaştırarak pandemi süresince meydana gelebilecek ikincil bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için yol gösterici olabilmek amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (04.02.2021 tarih ve 02-44 No.lu karar) onaylanmıştır ve Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak yapılmıştır.

Çalışmamızda, Elâzığ Fethi Sekin Şehir Hastanesi YBÜ'lerinden laboratuvarımıza gönderilen kan kültürü örneklerinin sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. Hastanemiz 1038 yataklı bir hastanedir ve YBÜ'sinde 183 yatak bulunmaktadır. 1 Mart 2020-1 Mart 2021 döneminde hastanemiz COVID-19 YBÜ'nde yatan orofaringeal, nazofaringeal sürüntülerinde gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi pozitif olan ya da PCR testi negatif olup, klinik, toraks bilgisayarlı tomografisi (BT) ve laboratuvar bulgularıyla COVID-19 tanısı düşünülen hastalarda üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları ile PÖ 1 Mart 2019-29 Şubat 2020 tarihleri arasındaki

dönemde YBÜ'de yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. İki kan kültürü setinde aynı bakteri üreyen hastalar çalışmaya dâhil edilmiştir. Aynı hastadan aynı anda alınan kan örneklerinden yalnızca birinde cilt florasına ait olan *Bacillus*, mikrokoklar, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* ve koagülaz negatif stafilokok (KNS) üerse, bu durum kontaminasyon olarak kabul edilmiştir. Hastalardan gelen yineleyen kan kültürleri çalışmaya alınmamıştır.

Laboratuvarımıza gelen kan kültürü şişeleri BACTEC 9120 (Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, ABD) otomasyon sistemi ile takip edilmiştir. Kan kültürü şişelerinden "pozitif uyarı" verenler koyun kanlı ve Eosin Metilen Mavisini besiyerlerine pasajlanıp, aerop koşullarda 37° C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Üreyen mikroorganizmalar morfolojik açıdan Gram boyama ile değerlendirilmiş, mikroorganizmaların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıkları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)⁽⁵⁾ kriterlerine göre ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda otomatize Vitek version 2.0 (BioMérieux, Fransa) ile çalışılmıştır. Kolistin direnci sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kolistin sülfat (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışılmıştır.

Araştırmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, "Statistical Package for Social Science for Windows" (SPSS) 24.0 paket programı kullanılmıştır. Araştırmada değerlendirilen hastaların tanıtıcı özelliklerinin (cinsiyet), bakteri ve antibiyotik duyarlılık dağılımlarının belirlenmesinde frekans ve yüzde dağılımı analizi kullanılmıştır. Araştırmaya katılanların yaş değerlerinin belirlenmesinde ortalama ve standart sapma değerleri incelenmiştir.

Analizin temel amacını oluşturan araştırma sonucunda üreyen mikroorganizmaların ve antibiyotik duyarlılıklarının, PÖ dönem ve PD hastaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gösterip göstermediğini incelemek amacıyla ki-kare bağımsızlık testi analizleri uygulanmıştır. Ayrıca araştırma kapsamında incelenen ve üremesi olan hastaların yaş değerlerinin PÖ dönem ve

PD hastaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklarını incelemek amacıyla bağımsız örneklem t-testi uygulanmıştır. Sonuçlar %99 ($p<0.01$) ve %95 ($p<0.05$) güven düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

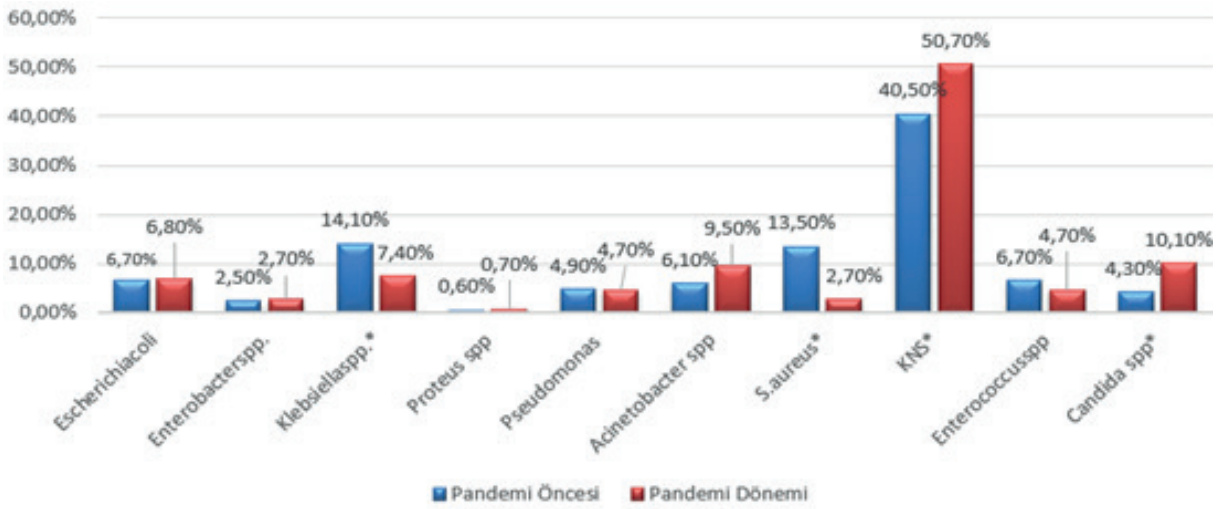
BULGULAR

Çalışmamızda 1 Mart 2019-1 Mart 2021 tarihleri arasında laboratuvarımıza toplam 2221 kan kültürü örneği gönderilmiş ve 311 kan kültürü örneğinde üreme olmuştur. Üreme olan kültürlerin 163 (%52.4)'ü COVID-19 öncesi döneme, 148 (%47.6)'i PD'ne aittir.

COVID-19 öncesi dönemde toplam 1.374 kan kültürü örneği gelmiştir ve 163 (%11.9)'ünde üreme olmuştur. PD'nde ise toplam 847 kan kültürü örneği gelmiştir. Bunlardan 148 (%17.5)'inde üreme olmuştur.

Pandemi öncesinde hastaların yaş ortalaması 62 ± 2 , PD'nde ise hastaların yaş ortalaması 80 ± 2 olarak bulunmuştur. Buna göre, PD'nde üreme olan hastaların ortalama yaşları, PÖ dönemdeki hastaların ortalama yaşlarından istatistiksel olarak anlamlı yüksek belirlenmiştir ($p<0.05$). PÖ'nde hastaların %44.2'si kadın hasta, %55.8'i erkek hasta, PD'nde hastaların %31.8'i kadın, %68.2'si ise erkek hasta olarak saptanmıştır. PD'nde erkek hastalarda daha fazla üreme olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

COVID-19 öncesi dönemde toplam 1.374 kan kültürü örneği gelmiştir. Bu örneklerin 163 (%11.9)'ünde üreme olmuştur. Üreme olanların 57 (%35.0)'sinde Gram-negatif, 99 (%60.7)'unda Gram-pozitif bakteri, 7 (%4.3)'sinde maya belirlenmiştir. Kontaminasyon oranı ise %19.9 olarak bulunmuştur. PD'nde ise toplam 847 kan kültürü örneği gelmiştir. Bunlardan 148 (%17.5)'inde üreme olmuştur. Üreme olanların 47 (%31.8)'sinde Gram-negatif, 86 (%58.1)'sinde Gram-pozitif bakteri, 15 (%10.1)'inde maya saptanmıştır. Kontaminasyon oranı ise %21.6 olarak bulunmuştur. PÖ yoğun bakımlarda ve PD yoğun bakımlarda kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaların dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Pandemi öncesi yoğun bakım ve pandemi dönemi yoğun bakımlarda kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaların dağılımı

İki dönem arasında Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin üreme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir ($p>0.05$). İki dönem arasında *Klebsiella* spp, *S. aureus*, KNS ve mayaların üreme oranlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Pandemi öncesi yoğun bakımlarda ve PD yoğun bakımlarda üreyen Gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları Tablo 1'de gösterilmiştir. *Escherichia coli* için antibiyotik duyarlılıklarına genel olarak bakıldığında PD'nde, PÖ döneme göre bir artış söz konusudur. *E. coli* için amikasin ($p<0.05$) ve gentamisin ($p<0.05$) duyarlılıklarında dönemler

Tablo 1. Pandemi öncesi yoğun bakımlarda ve pandemi dönemi yoğun bakımlarda tespit edilen gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları

	<i>E.coli</i>		<i>Enterobacter spp.</i>		<i>Klebsiella spp.</i>		<i>Pseudomonas spp.</i>		<i>Acinetobacter spp.</i>	
	PÖ	PD	PÖ	PD	PÖ	PD	PÖ	PD	PÖ	PD
	11	10	4	4	23	11	8	7	10	14
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
AK	63.6*	100	50	50	34.8	54.4	87.5	100	10	7.14
GN	54.5*	100	75	50	43.5	45.5	87.5	100	10	14.3
IMP	100	100	75	50	73.9*	36.4	100	100	10	0
MEM	100	100	75	50	30.4	27.3	100	85.7	10	0
CIP	18.2	20	75	50	21.7	9.1	87.5	85.7	10	0
PTZ	100	90	50	25	17.4	9.1	87.5	71.4	-	0
FEP	18.2	40	75	25	17.4	18.9	100	100	-	-
CTX	18.2	40	75	25	17.4	27.3	-	-	-	-
CAZ	18.2	40	75	25	21.7	9.1	100	100	0	0
SXT	36.7	50	75	50	26.9	27.3	-	-	0	14.3
CI	90.9	100	75	75	56.5	45.5	87.5	100	100	100
GSBL pozitifliği	54.5	40	50	50	43.4	45.5	-	-	-	-

PÖ: Pandemi öncesi; PD: Pandemi dönemi; AK: Amikasin; GN: Gentamisin; IMP: Imipenem; MEM: Meropenem; CIP: Siprofloksasin; PTZ: Piperasilin-Tazobaktam; FEP: Sefepim; CTX: Cefotaxim; CAZ: Seftazidim; SXT: Trimetoprim/ sulfametoksazol; SAM: Ampisilin-Sulbaktam; CI: Kolistin.

arasında ortaya çıkan değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *Klebsiella* spp. için imipenemin pandemi öncesi döneme göre duyarlılığındaki azalma ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. için ise PÖ ve PD antibiyotik duyarlılıklarında ortaya çıkan değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Pandemi öncesi yoğun bakımlarda ve PD yoğun bakımlarda üreyen Gram-pozitif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Pandemi öncesi yoğun bakımlarda ve pandemi dönemi yoğun bakımlarda üreyen gram pozitif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları

	<i>S.aureus</i> PÖ n=22 %	<i>S.aureus</i> PD n=4 %	KNS PÖ n=66 %	KNS PD n=75 %
PEN	13.6	0	6.1	-
ERY	50	100	13.6	25.3
CLI	50	100	39.4	36
LNZ	86.4	100	86.7	74.7
VAN	100	100	86.7	100
TEİ	100	100	86.7	100
FOX tarama	50	75	51.5	54.1

PÖ: Pandemi öncesi; PD: Pandemi dönemi. PEN: penisilin;
ERY: eritromisin; CLI: klindamisin; LNZ: linezolid; VAN: vankomisin;
TEİ: teikoplanin; FOX: Sefoksitin.

Tablo 3. Pandemi öncesi yoğun bakım ve pandemi dönemi yoğun bakımlarda üreyen *Enterococcus* spp.'nin. antibiyotik duyarlılıkları

	<i>Enterococcus</i> spp. PÖ n=11 %	<i>Enterococcus</i> spp. PD n=7 %
AM	63.6	42.9
GEN	45.5	42.9
SXT	36.6	57.1
LNZ	100	100
VAN	100	85.7
TEİ	90.9	85.7

PÖ: Pandemi öncesi; PD: Pandemi dönemi; AM: Ampisilin;
GEN: Gentamisin; SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole; LNZ: linezolid;
VAN: vankomisin; TEİ: teikoplanin.

S. aureus ve KNS için, PÖ ve PD antibiyotik duyarlılıklarının hiçbirinde ortaya çıkan değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Enterococcus spp'nin PÖ ve PD antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde ampisilin, gentamisin, vankomisin ve teikoplanin duyarlılıklarında PD'nde, PÖ döneme göre bir azalma gözlenmiştir. Fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). PÖ dönemde ve PD'inde üreyen *Enterococcus* spp. 'nin antibiyotik duyarlılık oranları Tablo 3'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Yoğun bakımda yatan hastalar, genel durum bozuklukları, hastanede yatış süresinin uzaması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılması, uygulanan invazif girişimler gibi nedenlerle dirençli mikroorganizmalarla kolonizasyon ve enfeksiyona yatkınlık gösterebilmektedirler⁽⁶⁾. Sepsisin acil müdahale gerektiren enfeksiyon hastalıkları arasında özel bir yeri vardır. Sepsise neden olan mikroorganizmanın kan kültüründe üretilerek antibiyotiklere duyarlılığının saptanması hastanın tedavisini önemli oranda kolaylaştırır⁽⁷⁾.

COVID-19 ile enfekte kişilerde klinik %81 oranında hafif seyir göstermekle beraber, %14'ü ağır seyretmekte, hastaların %5'i yoğun bakım gereksinimi duymaktadır⁽⁸⁾, Zhou ve ark.⁽⁹⁾, COVID-19 pandemisinde ölen COVID-19 hastalarının %50'sinin ikincil bakteriyel enfeksiyonlara sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda, kan kültürlerinde Gram-negatif mikroorganizma üreme oranı %24.85 ile %37.8 arasında, Gram-pozitif mikroorganizma üreme oranı %59.3 ile %64.7 arasında bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Bizim çalışmamızda da yapılan çalışmalarla uyumlu üreme oranları belirlenmiştir. Ancak, iki dönem arasında Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin üreme oranları arasındaki ilişki anlamlı saptanmamıştır ($p>0.05$).

Kan kültürlerinden en sık üreyen ve çalışmalarda en sık kontaminasyon etkeni olarak bildirilen mikroorganizmalar Gram-pozitif koklar özellikle de koagülaz negatif stafilokoklardır⁽¹¹⁾. Çalışmamızda, hem PÖ yoğun bakımlarda (%40.5) hem de PD yoğun bakımlarında (%50.7) en fazla KNS üremesi saptanmıştır. Çalışmamızda, PD'nde KNS üremesinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, KNS suşlarının metisilin direnci ortalama %40 ile %90.7 arasında değişmektedir⁽¹²⁻¹⁵⁾. Bizim çalışmamızda da benzer olarak PÖ yoğun bakımlarda %51.5, PD yoğun bakımlarda %54.1 metisilin direnci belirlenmiştir. Vankomisin ve teikoplanin, metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde en çok tercih edilen antibiyotiklerdir. Ancak, son zamanlarda glikopeptid grubu antibiyotiklere duyarlılığı azalmış kökenler bildirilmiştir⁽¹⁴⁾. Çalışmamızda, iki dönemde de KNS suşları vankomisin ve teikoplanine %100 duyarlı saptanmıştır.

Staphylococcus aureus'u kan kültürlerinde Küçükateş ve Gültekin⁽¹¹⁾ %24.87 oranında, Bıçak ve ark.⁽¹⁶⁾ %11.5, Coşkun⁽¹⁷⁾ %13.7, Kula-Atik ve Uzun⁽¹⁸⁾ %8.6 oranında saptamışlardır. Çalışmamızda, *S. aureus* PÖ yoğun bakımlarda %13.5 ile ikinci sırada iken, PD yoğun bakım ünitelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı oranda daha düşük %2.7 olarak belirlenmiştir. *S. aureus* suşlarında metisilin direnci küresel sürveys verilerine göre ülkeler, bölgeler, hastaneler ve hatta aynı hastanenin servisleri arasında değişkenlik gösterebilmektedir⁽¹⁹⁾. Telli ve ark.⁽²⁰⁾ *S. aureus* suşlarında metisilin direncini %15.3, Şay-Coşkun⁽¹⁷⁾ %30.6, Kula-Atik ve Uzun⁽¹⁸⁾ %40 olarak bildirmişlerdir. Tanrıverdi ve ark.⁽²¹⁾ *S. aureus* suşlarında metisilin direncini %22.3 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda, *S. aureus* metisilin direnci PÖ yoğun bakımlarda ve PD yoğun bakımlarda sırasıyla %50 ve %75 olarak belirlenmiştir. Metisilin direnç oranımız *S. aureus* için yüksek olmakla birlikte, az sayıda *S. aureus* saptandığından gerçek oranı yansıtmayabileceği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda, geniş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üretimi *E. coli*'de %32-67, *Klebsiella* spp.'de ise %38-74 arasında değişen oranlarda

bildirilmektedir⁽²²⁾. Çalışmamızda, GSBL üretimi bu verilerle uyumludur ve iki dönem arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir. Ancak, Hamidi ve ark.⁽²³⁾ çalışmalarında, PD'nde *E. coli*'de GSBL oranının %40.5'ten %35.2'ye azaldığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da PD'nde GSBL oranının *E. coli*'de anlamlı olmasa da %54.5'ten %40'a düştüğü görülmüştür. Ancak, GSBL saptamamız cihaz ile yapılmıştır. İzolatların stoklarını yine canlandırarak kombine disk yöntemi ile GSBL testlerinin doğrulanması olası olmamıştır. Central Asian and Eastern European Surveillance on Antimicrobial Resistance (CAESAR) enterik bakterilerde direnç oranlarının 2017 yılı verilerine göre Türkiye için karbepenem direnci *E. coli*'de %4, *Klebsiella* spp.'de %38 olarak bildirilmiştir⁽²⁴⁾. Çalışmamızda, iki dönemde de CAESAR verilerine yakın olarak *E. coli*'de karbepenem direnci saptanmamıştır. *Klebsiella* spp. için üreme oranı anlamlı ($p<0.05$) olarak PD'nde azalmış olmakla birlikte, imipenem duyarlılığında ise istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma belirlenmiştir. ($p<0.05$). Meropenem duyarlılığının ise iki dönemde de %40'ın altında olduğu görülmüştür.

Özellikle bazı Gram-negatif bakteriler *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. gibi immuniteleri baskılanmış hastaların fazla olarak buldukları yoğun bakım ünitelerinde neden olduğu bakteriyemik enfeksiyonların tedavileri zordur. Ayrıca, direnç gelişimi ve mortalite oranları çok yüksektir⁽²⁵⁾. Barış ve ark.⁽²⁶⁾ ile Şirin ve ark.⁽⁶⁾ kan kültürü örneklerinden sırasıyla %6.8 ve %13.1 oranında *Acinetobacter* spp., %4.1 ve %4.8 oranında ise *P. aeruginosa* izole etmişlerdir. Çalışmamızda, *Acinetobacter* spp. ve *P. aeruginosa* çalışmalarla uyumlu olarak saptanmıştır. Çetin ve ark.⁽²⁷⁾, Uzun ve ark.⁽²⁸⁾ ve Alışkan ve ark.⁽²⁹⁾ imipenem duyarlılığını *P. aeruginosa*'da sırasıyla %68, %82 ve %51; *A. baumannii*'de %38, %14 ve %61 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda, PÖ dönemde kan kültürlerinde *Acinetobacter* spp.'nin ve *P. aeruginosa*'nın imipenem duyarlılığı sırasıyla %10 ve %100 iken, PD yoğun bakımlarda %0 ve %100 olarak saptanmıştır. Hastanemizde *Acinetobacter* spp.'nin imipenem duyarlılığının oldukça düşük olduğu PD'nde daha da düştüğü görülmüştür. Ancak, anlamlı bir değişim belirlenememiştir. *Acinetobacter* spp. suşlarında PD'nde karbepenem

duyarlı suşun olmaması klonal bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür.

Kolistinin *A. baumannii* izolatlarına karşı en etkili antimikrobiyal olduğu bildirilmekle birlikte, son yıllarda kolistin direncinin arttığı görülmektedir⁽³⁰⁾. Buna karşılık, çalışmamızda iki dönemde de kolistin dirençli suş saptanmamıştır.

Çalışmamızda, COVID-19 öncesinde kan kültürde mayaların görülme sıklığı %4.3 iken, COVID-19 yoğun bakımlarda kan kültüründe %10.1 oranı ile en çok belirlenen ikinci mikroorganizma olmuştur. PD'nde kan kültüründe maya saptanmasının anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Bu durumun hastaların yoğun bakımda yatış süresinin uzaması ve steroid kullanımına bağlı olduğu düşünülmüştür. Yoğun bakımdaki hastaların %6 ile %10'unu etkileyen *Candida*, en sık görülen patojenler arasındadır ve bazı çalışmalarda, kandidemi için artan bir eğilimde olduğu belirtilmiştir⁽⁵⁾. Türkiye'de kan dolaşım enfeksiyonlarının araştırıldığı çok merkezli çalışmalarda yoğun bakım ünitelerinde %4.7 ile 10.8 oranında *Candida* türlerinin enfeksiyondan sorumlu olduğu bildirilmiştir⁽³¹⁾. İnvaziv maya enfeksiyonları, antifungal tedavi alanlara kıyasla tedavi almayan COVID-19 olgularında, daha yüksek mortalite ile ilişkili olduğundan klinik başarıya ulaşmak için hızlı tanı ve tedavi büyük önem taşımaktadır⁽⁶⁾. Brezilya'daki iki tıp merkezinde yapılan bir çalışmada, yüksek dozda steroid alan COVID-19 hastalarında kandidemi sıklığında on kat artış gözlemlenmiştir⁽³²⁾.

Sonuç olarak, hastanede yatış süresinin uzaması ve COVID-19 tedavisinde yüksek düzey steroid kullanımına bağlı hastanemiz yoğun bakım hastalarında kandideminin arttığı düşünülmüştür. *Candida* enfeksiyonları için erken teşhis ve izleme, şiddetli COVID-19 fungal ko-enfeksiyonu olan hastalarda COVID-19'dan ölümleri azaltmada önemli rol oynayacaktır. Ayrıca *Klebsiella* spp.'de karbepenem direncinin COVID-19 PD'nde anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Karbepenem ile ampirik tedaviye başlamak gerektiğinde bu durum göz önünde tutularak ampirik tedavi için kombine tedavi seçenekleri değerlendirilebilir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (04.02.2021 tarih ve 2-44 kayıt numarası) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Fırat University, Noninvasive Research Ethics Committee (02.04.2021; 2-44).

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

KAYNAKLAR

1. 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>
2. Hoenigl M, Wagner J, Raggam RB, et al. Characteristics of hospital-acquired and community-onset blood stream infections, South-East Austria. PLoS One. 2014;9(8):e104702.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104702>
3. Başustaoğlu A. Kan kültürü uygulama kılavuzu. Ankara: 2013.
4. Tanrıverdi SE, Yakupoğulları Y, Otlu B. COVID-19 tanısı: Serolojik ve moleküler testler. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2020;29(Özel Sayı 1):31-7.
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/aktd/issue/58233/841123>
5. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [http:// www.eucast.org]. (Erişim tarihi: 04.03.2021)
6. Şirin MC, Ağuş N, Yılmaz N, et al. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. Turk Hij Den Biyol Derg. 2017;74(4):269-78.
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2017.94899>
7. Florio W, Morici P, Ghelardi E, Barnini S, Lupetti A. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections. Crit Rev Microbiol. 2018;44(3):351-70.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1407745>

8. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2020;41(2):145-51.
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003>
9. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-62.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
10. Duman Y, Kuzucu C, Çuğlan SS. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Erciyes Tıp Derg*. 2011;33(3):189-96.
11. Küçükateş E, Gültekin N. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Haseki Tıp Bul*. 2016;54(2):97-102.
<https://doi.org/10.4274/haseki.2872>
12. Yiğit N, Aktaş AE, Doğruman Al F, Ayyıldız A. Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilokokların tiplendirilmesi ve metisilin direnci. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2008;65(2):61-6.
13. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004;32(8):470-85.
<https://doi.org/10.1016/S0196655304005425>
14. Çalık Ş, Tosun S, Altın Ü, Arı A, Olut Al, Yüksel Ergin Ö. Kan kültürlerinden izole edilmiş koagülaz-negatif stafilokokların klinik önemi var mı? *Flora*. 2017;22(1):34-41.
<https://doi.org/10.5578/flora.58643>
15. Asaad AM, Ansar Qureshi M, Mujeeb Hasan S. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolates from nosocomial bloodstream infections. *Infect Dis (Lond)*. 2016;48(5):356-60.
<https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1122833>
16. Bıçak İ, Varışlı AN, Peker SA. Kan kültüründen izole edilen etkenlerin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları: dört yıllık verilerimiz. *Cerrahi Ameliyathane Sterilizasyon Enfeksiyon Kontrol Hemşireliği Derg*. 2020;1(1):8-19.
17. Şay Coşkun US. Kan kültürlerinden üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*. 2018;32(2):45-52.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2018.045>
18. Kula Atik T, Uzun B. Kan kültürlerinden izole edilen *staphylococcus aureus* suşlarının metisiline ve diğer antimikrobiyal ajanlara direnç durumlarının değerlendirilmesi. *Klimik Derg*. 2020;33(2):132-6.
<https://doi.org/10.5152/kd.2020.28>
19. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution and epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00020-18.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
20. Telli M, Okulu Y, Pat Y. *Staphylococcus aureus* suşlarında metisiline direnç oranındaki değişim: Metisiline direnç azalıyor mu? *Ankem Derg*. 2018;32(3):103-8.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2018.1816>
21. Tanrıverdi ES, Duman Y, Tekerekoğlu MS. Bir üniversite hastanesinde 2018-2019 yıllarında izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının incelenmesi. *Fırat Tıp Derg*. 2020;25(4):184-8.
22. Köksal Çakırlar F, Uyar Y, Özdemir S, ve ark. 2011-2014 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal direnç durumları. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2017;74(1):55-70.
23. Hamidi AA, Yılmaz Ş. Antibiotic consumption in the hospital during COVID-19 pandemic, distribution of bacterial agents and antimicrobial resistance : A single-center study. *J Surg Med*. 2021;5(2):124-7.
<https://doi.org/10.28982/josam.834535>
24. WHO/Europe. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2019. https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/418863/53373-WHO-CAESAR-annual-report-2019.pdf (Erişim tarihi:02.04.2021)
25. Kılınç Ç, Güçkan R, Kahveci M, Kayhan Y, Pirhan Y, Özalp T. Kan kültürlerinde üreyen gram negatif izolatların dağılımı ve antibiyotik direnç profilleri. *Int J Basic Clin Med*. 2015;3(3):125-30.
26. Barış A, Bulut ME, Öncül A, Bayraktar B. Distribution of clinical isolates at species level and their antibiotic susceptibilities in intensive care units patients. *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi*. 2017;15(1):21-7.
27. Sesli Çetin E, Kaya S, Pakba İ, ve ark. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Turgut Özal Tıp Merk Derg*. 2015;14(2):69-73.
28. Uzun B, Gungor S, Yurtsever SG, Afsar İ, Demirci M. Yoğun bakım hastalarının kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. *Ankem Derg*. 2012;26(2):55-60.

29. Alişkan H, Colakoğlu S, Turunç T, ve ark. Yoğun bakım ve servis hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarının antibiyotik duyarlılık oranlarının dört yıllık izlemi. Mikrobiyol Bul. 2008;42(2):321-9.
30. Lee C-R, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>
31. Kula Atik T, Çetin Duran A. Investigation of *Candida* species isolated from blood cultures. Van Med J. 2021;28(1):32-7. <https://doi.org/10.5505/vtd.2021.73383>
32. Riche CVW, Cassol R, Pasqualotto AC. Is the frequency of candidemia increasing in COVID-19 patients receiving corticosteroids? J Fungi (Basel). 2020;6(4):286. <https://doi.org/10.3390/jof6040286>

COVID-19 Hastalarının Alt Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilen Bakteriyel Etkenlerin İdentifikasyonu ve Antibakteriyel Direnç Paternlerinin İncelenmesi

Identification of Bacterial Agents Isolated from Lower Respiratory Samples of COVID-19 Patients and Investigation of their Antibacterial Resistance Patterns

Tuğba Avan Mutlu*^o, Taylan Bozok**^o

* Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Niğde, Türkiye

** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Mersin, Türkiye

Atıf/Cite as: Avan Mutlu T, Bozok T. COVID-19 hastalarının alt solunum yolu örneklerinden izole edilen bakteriyel etkenlerin identifikasyonu ve antibakteriyel direnç paternlerinin incelenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):48-55.

Öz

Amaç: Bu çalışmada amaç, COVID-19 hastalığı nedeni ile yatan hastalarda meydana gelen sekonder bakteriyel enfeksiyon etkenlerini tanımlamak ve bu etkenlerin antibakteriyel direnç durumlarını belirlemektir. Böylece sekonder enfeksiyon düşünülen hastalarda başlanacak ampirik tedavi için öngörü sağlanarak gereksiz antibiyotik kullanımı önlemede katkıda bulunulacaktır.

Yöntem: Çalışmamızda, Mart 2020 ve Şubat 2021 tarihleri arasında Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde COVID-19 nedeni ile Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'nde yatan hastalardan gönderilen alt solunum yolu örneklerinden izole edilen toplam 315 adet izolat incelenmiştir. Demografik ve laboratuvar verileri hastane otomasyon sisteminden retrospektif olarak analiz edilmiştir. Bakteriyel izolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığı Vitek 2 Compact (Biomerieux, Fransa) cihazı ile yapılmış ve EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Bulgular: COVID-19 nedeni ile hastanemizde yatan 5.753 hasta incelenmiş ve bunlardan YBÜ'de bulunan 315'inde (%5.5) sekonder bakteriyel enfeksiyon belirlenmiştir. Pandemi döneminde Gram-negatif bakterilerden en çok sırayla *Acinetobacter baumannii* (%47.8), *Klebsiella pneumoniae* (%13.4) ve *Pseudomonas aeruginosa* (%12.0) üremesi görülmüştür. Gram-pozitif bakteriler arasında en çok sırayla *Staphylococcus aureus* (%4.5) ve *Enterococcus spp.* (%2.1) bakterileri üremiştir.

Sonuç: Çoklu ilaca dirençli bakteriler, morbidite ve mortalitenin artmasına neden olur. Bu nedenle antibiyotik tedavisine duyulan gereksinim çabucak değerlendirilmeli ve uygun olmadığında kesilmelidir. Nosokomial enfeksiyonların uygun kontrolünün sağlanması ile COVID-19 hastalarında sekonder bakteriyel enfeksiyon gelişiminin önlenmesi ve bu dirençli türlerin yayılmasını sınırlamak önemlidir.

Anahtar kelimeler: COVID-19, sekonder bakteriyel enfeksiyon, antibiyotik duyarlılık

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to identify the secondary bacterial infection agents in hospitalized patients due to COVID-19 disease, determine their antibacterial resistance patterns, and thus prevention of unnecessary antibiotic use by providing foresight for the empirical treatment given to patients with secondary infection.

Methods: In our study, 315 isolates from lower respiratory tract samples of patients hospitalized in the intensive care unit (ICU) due to COVID-19 in Niğde Training and Research Hospital between March 2020 and February 2021 were examined. Demographic and laboratory data were analyzed retrospectively from the hospital automation system. Identification of bacterial isolates and antibiotic susceptibility were performed with Vitek 2 Compact device and evaluated according to EUCAST criteria.

Results: 5753 patients hospitalized in our hospital due to COVID-19 were examined, and secondary bacterial infection was detected in 315 (5.5%) of them in the ICU. During the pandemic, *Acinetobacter baumannii* (47.8%), *Klebsiella pneumoniae* (13.4%) and *Pseudomonas aeruginosa* (12.0%) growth were observed frequently among Gram-negative bacteria. Among the Gram-positive bacteria, growth was noted for *Staphylococcus aureus* (4.5%) and *Enterococcus spp.* (2.1%).

Conclusion: Multidrug-resistant bacteria cause increased morbidity and mortality. Therefore, the need for antibiotic therapy should be evaluated promptly and discontinued when inappropriate. With proper control of nosocomial infections, it is important to prevent the development of secondary bacterial infections in COVID-19 patients and to limit the spread of these resistant strains.

Keywords: COVID-19, secondary bacterial infection, antibiotic susceptibility

Alındığı tarih / Received:

14.10.2021 / 14.October.2021

Kabul tarihi / Accepted:

07.12.2021 / 07.December.2021

Erken çevrimiçi / First Published:

31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

T. Avan Mutlu 0000-0001-7242-9971

T. Bozok 0000-0002-7094-4838

✉ tuba.avan@hotmail.com

GİRİŞ

COVID-19 ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmış ve hızla tüm dünyaya yayılarak küresel bir tehdit hâline gelmiştir. Şubat 2021 itibarıyla yaklaşık 107 milyon kişi enfekte olurken, 3 milyon kişi hayatını kaybetmiştir⁽¹⁾. Bu enfeksiyona yakalanan hastaların yaklaşık %20'sinde hastalığın şiddeti ağır geçmiş ve prognoz kötü seyretmiştir. Yapılan çalışmalar, prognozu kötü seyreden yoğun bakım hastalarında sekonder enfeksiyon oranında artış bildirmiştir⁽²⁾. Bu durum, COVID-19 yönetiminde klinisyenler için önemli bir sorun oluşturmuştur. COVID-19 olgularında gelişen sekonder bakteriyel enfeksiyon patogenezi; viral patojenlerin virülansı, immün yanıtın düzensizliği ve bozulmuş mikrobiyota etkileşimleri ile açıklanmıştır. Gelişen sekonder bakteriyel pnömoni bu hasta grubunda klinikte hızla kötüye gitmeye, viral yükün yeniden yükselmesine ve kritik hastalarda yüksek mortaliteye neden olmuştur⁽³⁾. Yeni çıkan bu enfeksiyonun yanı sıra bakteriyel antibiyotik direnci Dünya'da hızla artmakta ve tehlikeli bir halk sağlığı sorunu olarak geleceğimizi tehdit etmeye devam etmiştir. Mevcut COVID-19 salgını, antimikrobiyal yönetim çalışmalarını etkileyebilecek ve antimikrobiyal direnci artırabilecek potansiyel tehditler içermiştir. Örneğin, pnömoni olmaksızın hafif hastalık veya orta derecede pnömoni ile başvuran birçok kişiye antibiyotik tedavisi verilmiştir⁽⁴⁾. Hastanede yatan COVID-19 hastalarında yapılan bir çalışmada, hastaların %72'sine antibiyotik tedavisi verildiğini ve bunlardan yalnızca %8'inde bakteriyel veya fungal ko-enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾. Ayrıca, hastaneye yatışlar hastane kaynaklı enfeksiyon riskini ve çoklu ilaca dirençli organizmaların bulaşma riskini artırmış ve bu da antimikrobiyal kullanımın artmasına neden olmuştur⁽⁶⁾. Yakın zamanda yoğun bakımda bulunan hastalardan yapılan başka bir araştırmada, hastaların yalnızca %54'ünün bakteriyel enfeksiyondan şüphelenmesine veya kanıtlanmış enfeksiyon olmasına rağmen, %70'inin profilaksi veya tedavi amaçlı en az bir antibiyotik aldığını göstermiştir⁽⁷⁾. Farklı çalışmalarda, COVID-19 hastaları arasında ek enfeksiyon prevalansı değişkenlik göstermekle birlikte yaşamını kaybeden hastaların %50'sinde ek enfeksiyon bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, bu hastalarda COVID-19'un yanı

sıra *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ve *Acinetobacter baumannii* gibi bakterileri; *Candida spp.* ve *Aspergillus flavus* gibi mantarları ve rinovirüs, parainfluenza virüs, metapnömovirüs, influenza-B virüsü gibi virüsleri sekonder enfeksiyon olarak saptanmıştır⁽⁷⁻¹¹⁾. Bu çalışmada amaç; COVID-19 hastalığı nedeni ile hastanede yatan hastalarda meydana gelen sekonder bakteriyel enfeksiyon etkenlerini tanımlamak ve bu etkenlerin antibakteriyel direnç durumlarını belirlemektir. Böylece başlanacak ampirik tedavi için öngörü uygulanacak gereksiz antibiyotik kullanımı önlenecektir. Ayrıca enfeksiyon kaynağının saptanması ile doğru hasta yönetimi sağlandığında zamansal ve mali yönden kazanç sağlanacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.02.2021 tarih ve 2021/12 No.lu karar) onaylanmıştır.

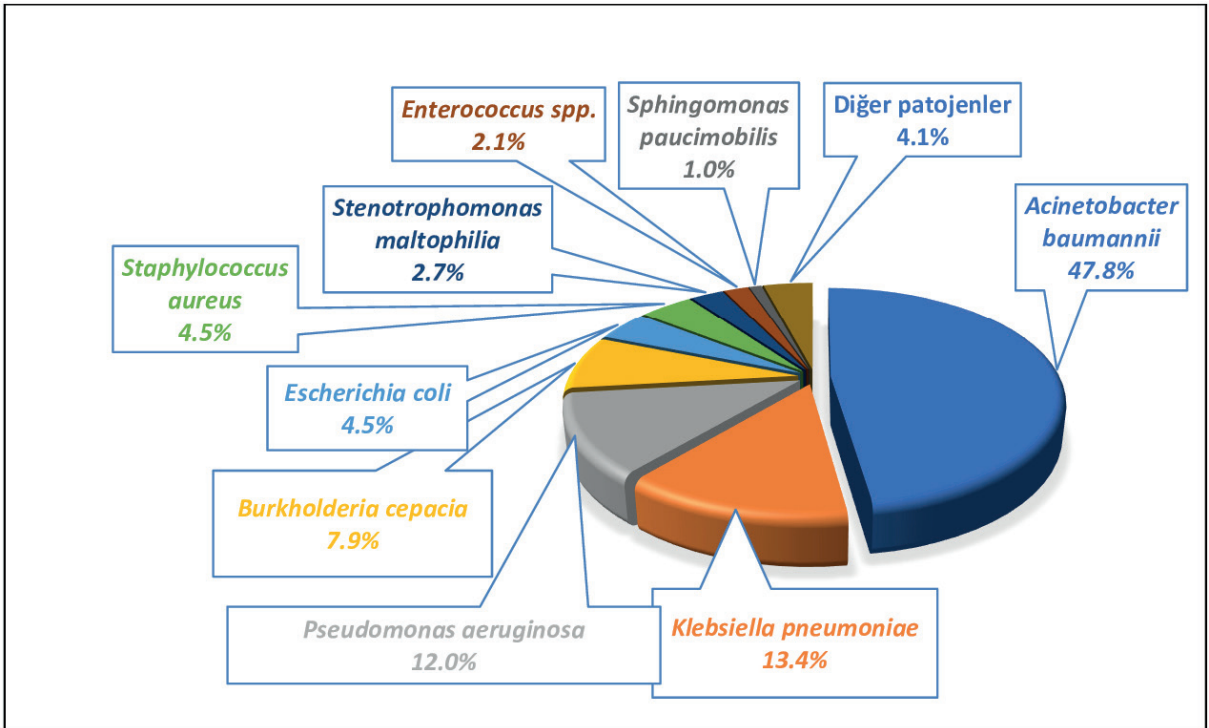
Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Mart 2020-Şubat 2021 tarihleri arasında COVID-19 hastalığı nedeni ile yoğun bakımda yatmakta olan hastalardan gönderilen Alt Solunum Yolu (ASY) örneklerinden (balgam ve trakeal aspirat) izole edilen toplam 315 adet izolat çalışmaya dâhil edilmiştir. Polimikrobiyal üreme görülen bazı hastalarda muhtemel etken olarak baskın olan ve antibiyogramı yapılmış tür çalışmaya dâhil edilmiştir. Yinelenen örnekler çalışmadan çıkarılmış, her hastadan tek örnek çalışmaya dâhil edilmiştir. COVID-19 pandemisinin alt solunum yolunda üreyen bakteri profiline etkisini daha iyi yorumlamak için pandemi öncesi dönemde yoğun bakımda yatan hastaların verileri de geriye yönelik incelenmiştir. Bunun için Ocak 2019 ile Aralık 2019 tarihleri arasında alt solunum yolundan alınan kültür verileri hastane otomasyon sisteminden incelenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen COVID-19 hastaları, solunum yolu materyallerinden viral RNA'nın belirlenmesi için Real Time-PCR (Qiagen, Rotor-Gene 5-Plex HRM) cihazı kullanılarak pozitif çıkmış olanlardan seçilmiştir.

Bakteriyel kültürler ve antimikrobiyal direnç paternleri hastane otomasyon sisteminden retrospektif olarak incelenmiştir. Balgam örneklerinden, Bartlett skorlamasına göre Gram boyalı preparatta >25 nötrofil/saha ve <10 yassı epitel/saha olan örnekler değerlendirilmeye alınmıştır. Örneklerin %5'lik koyun kanlı agar, çikolata agar ve EMB (Eozin Metilen Blue) agar besi yerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekimi yapılan plaklar 35±1°C'de 18-24 saat inkübe edilmiş ve üreme olmadıysa veya zayıf üreme varsa inkübasyon süresi 48 saate kadar uzatılmıştır. Tek koloni ekim tekniği sonucunda plağın yalnızca ilk kadranında varsa "az sayıda", ikinci kadranında varsa "orta sayıda", üçüncü kadranında varsa "çok sayıda" olarak semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonunda üreyen örneklerin Gram boyama, koloni morfolojisi, katalaz ve oksidaz test sonuçlarına göre ön değerlendirilmesi yapılmıştır. İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığı Vitek 2 Compact (Biomerieux, Fransa) cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen duyarlılık test sonuçları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Burkholderia cepacia için antibiyotik duyarlılık değerleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards

Institute) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Veriler Microsoft Excel®'e girilerek düzenlenmiştir. Ortalama, standart sapma ve yüzde değerler hesaplanarak gerekli kıyaslamalar yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda, COVID-19 nedeni ile Mart 2020 ve Şubat 2021 tarihleri arasında hastanemizde yatan 5.753 hasta incelenmiş ve bunlardan 315'inde (%5.5) sekonder bakteriyel enfeksiyon belirlenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen 315 hastanın 203'ü (%64.4) erkek, 112'si (%35.6) kadın hastadan oluştuğu görülmüştür. Yaş aralığı 18-94 olmak üzere ortalama yaş 68.0±14.9 olarak saptanmıştır. Hastalardan 124'ü (%39.4) yaşamını kaybetmiştir. Yaşamını kaybeden hastalardan 41'i (%33.1) kadın, 83'ü (%66.9) erkek hastadan oluşmuştur. Gram-negatif bakterilerden en çok sırayla *A. baumannii* (%47.8), *K. pneumoniae* (%13.4) ve *P. aeruginosa* (%12.0) üremesi görülmüştür. Gram-pozitif bakteriler arasında en çok sırayla *S. aureus* (%4.5) ve *Enterococcus spp.* (%2.1) bakterileri üremiştir (Şekil 1). COVID-19 pandemisi öncesi hastanemizde ASY'de üreyen mikroorganizmaların



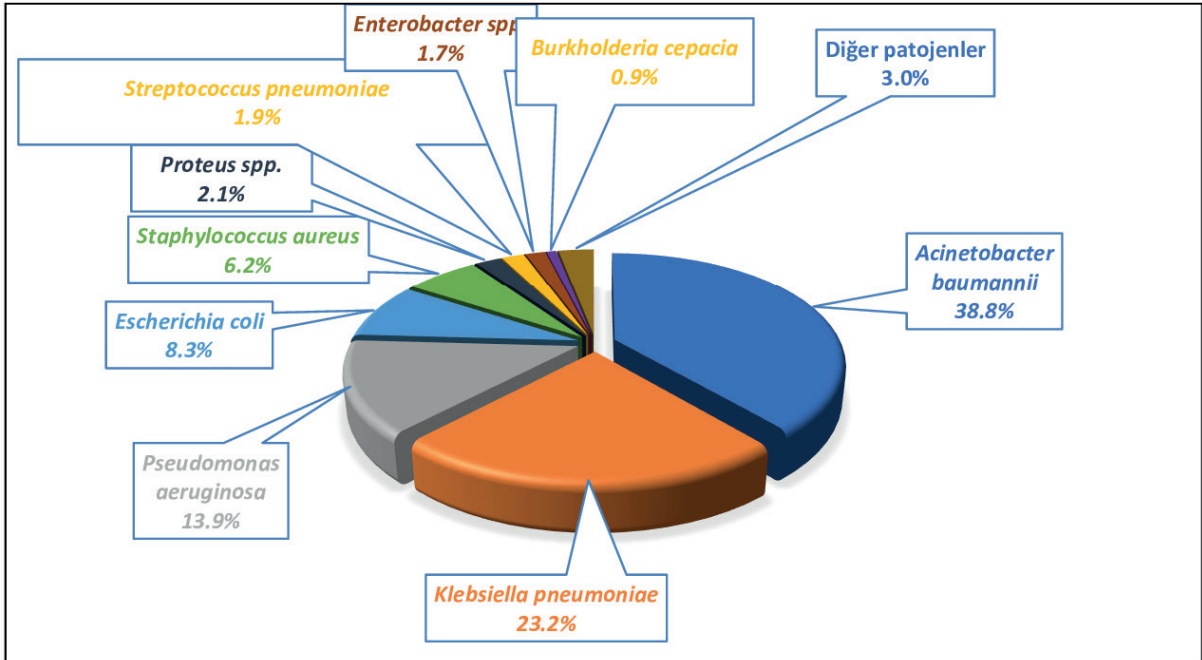
Şekil 1. COVID-19 hastalarında ASY'de üreyen mikroorganizmaların dağılımı

dağılımı ise Gram-negatif bakterilerden en çok sırayla *A. baumannii* (%38.8), *K. pneumoniae* (%23.2) ve *P. aeruginosa* (%13.9) üremesi görülmüştür. Gram-pozitif bakteriler arasında en çok sırayla *S. aureus* (%6.2) ve *S. pneumoniae* (%1.9) bakterileri üremiştir (Şekil 2). Yaş olarak karşılaştırıldığında, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* ve *Stenotrophomonas maltophilia* daha çok 65 yaş üstü hastalarda; *A. baumannii*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* ise daha çok 65 yaş altı hastalarda yoğun olarak üremiştir (Şekil 3). Hayatını kaybeden hastalar arasında en çok görülen sekonder enfeksiyon etkenleri *B. cepacia* (%78.3), *Sphingomonas paucimobilis* (%66.7) ve *S. maltophilia* (%50.0) şeklinde sıralanmıştır.

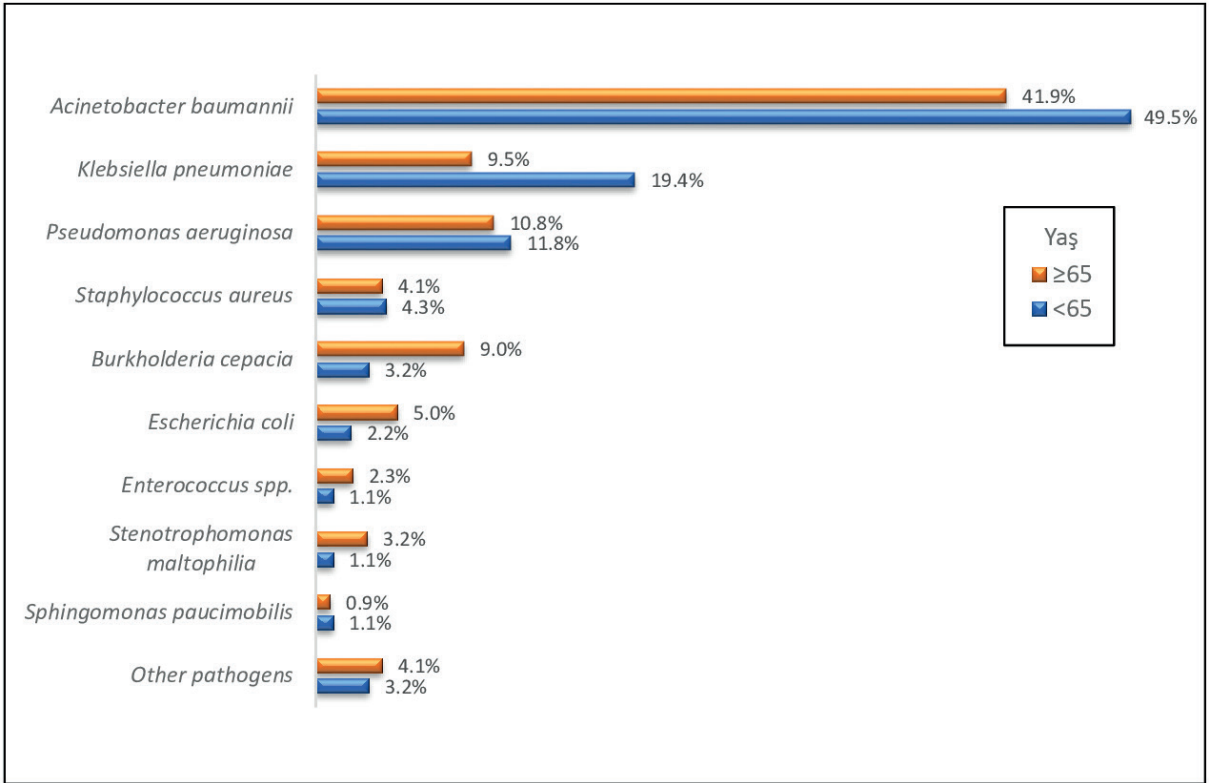
İzole edilen bakterilerin birçoğunun çoklu ilaç direncine sahip olduğu görülmüştür. Pandemi döneminde Gram-pozitif bakterilerden *S. aureus* suşlarında vankomisin direnci gözlenmezken *Enterococcus spp.* suşlarında %50.0 oranında vankomisin direnci saptanmıştır. Gram-negatif bakterilerden *A. baumannii* suşlarında amikasin (%88.5), gentamisin (%94.2), meropenem (%98.2), seftazidim (%98.6) ve siprofloksasin (%99.3) antibiyotiklerinde yüksek oranda direnç görülmüştür. Diğer Gram-negatif bakterilerden *K. pneumoniae*

suşlarında %66.7 amoksisilin-klavulanat, %35.9 meropenem, %64.1 piperasilin-tazobaktam ve %56.4 siprofloksasin oranlarında direnç; *P. aeruginosa* suşlarında %31.4 meropenem ve %48.0 piperasilin-tazobaktama oranlarında direnç; *E. coli* suşlarında ise %61.5 amoksisilin-klavulanat ve %76.9 siprofloksasine oranlarında direnç saptanmıştır.

Pandemi sürecindeki antibiyotik direnç patern değişimini doğru yorumlamak açısından pandemi öncesi antibiyotik duyarlılık paneli de incelenmiştir. Pandemi öncesinde Gram-pozitif bakterilerden *S. aureus* suşlarında vankomisin direnci %3.4 iken, *S. pneumoniae*'de %44.4 oranında penisilin direnci saptanmıştır. Gram-negatif bakterilerden *A. baumannii* suşlarında amikasin (%69.8), gentamisin (%89.6), meropenem (%99.5), seftazidim (%98.4) ve siprofloksasin (%98.4) antibiyotiklerinde yüksek oranda direnç görülmüştür. Diğer Gram-negatif bakterilerden *K. pneumoniae* suşlarında %69.7 amoksisilin-klavulanat, %74.3 meropenem, %90.8 piperasilin-tazobaktam ve %79.8 siprofloksasin oranlarında direnç; *P. aeruginosa* suşlarında %46.2 meropenem, %61.5 piperasilin-tazobaktam oranlarında direnç; *E. coli* suşlarında ise %17.9 amoksisilin-klavulanat, %35.9 gentamisin ve %61.5 siprofloksasin oranlarında direnç saptanmıştır.



Şekil 2. COVID-19 pandemisi öncesi hastanemizde ASY'de üreyen mikroorganizmaların dağılımı



Şekil 3. COVID-19 Hastalarında yaşa göre üreyen bakteri türleri yoğunluğu

TARTIŞMA

COVID-19, kimi hastalarda asemptomatik seyrederken, kimi hastalarda da ölümcül olabileceği gözlemlenmiştir. Yapılan bir araştırmaya göre, doğrulanmış olguların genel ölüm oranı %2.3 iken, yoğun bakım hastalarında ölüm oranı yaklaşık %50'ye kadar yükselmiştir⁽¹¹⁾. Yoğun bakım COVID-19 hastalarında ölüm oranının artmasına neden olan etkenlerden biri olabilen sekonder enfeksiyonlar, ihmal edilen önemli sorun olarak karşımıza çıkmıştır. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tanınması ve uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması kadar sekonder bakteriyel enfeksiyon olasılığının ihmal edilmemesinin de önemli olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada, COVID-19 hastalarında gelişen sekonder bakteriyel enfeksiyon etkenleri ve antibiyotik duyarlılıklarını açıklamak amaçlanmıştır.

Zhou ve ark.'nın⁽¹²⁾ yaptığı bir çalışmada, COVID-19 nedeniyle hastaneye kabul edilen 191 hastanın 28'inde (%15) sekonder bakteriyel enfeksiyon gözlemlenmiş, bu hastalardan 27'sinin yaşamını

kaybettiği bildirilmiştir. Zhang ve ark.'nın⁽²⁾ yaptığı çalışmada ise, durumu kritik olan 38 hasta incelenmiş, bu hastaların 21'inde sekonder solunum yolu enfeksiyonu bildirilmiştir. Saptanan etkenlerin %50'si Gram-negatif bakteri, %26'sı Gram-pozitif bakteri, %11'i virüs ve %7'si mantar olmak üzere en yaygın patojenler *K. pneumoniae*, *E. faecium*, *A. baumannii* ve HSV-1 olarak bildirilmiştir. Kim ve ark.'nın⁽¹³⁾ yaptığı başka bir çalışmada ise, SARS-CoV-2 için pozitif 116 hastadan 24'ünde (%20.7) bir veya daha fazla ek patojen saptanmış ve en yaygın ko-enfeksiyonlar rinovirüs/enterovirüs (%6.9) ve solunum sinsitiyal virüsü (%5.2) olarak belirlenmiştir. Sekonder bakteriyel enfeksiyonlarla ilgili Mısır'da yapılan ilk çalışmada, 260 olgu incelenmiş bu hastaların 28'inde (%10.7) bakteriyel ve/veya fungal ko-enfeksiyonlar görülmüştür. Gram-negatif bakteriler, Gram-pozitif bakterilere göre %71.4 daha baskın bulunmuştur. Bulunan bakterilerin %28.5'i *K. pneumoniae*, %16.6'sı *A. baumannii*, %9.5'u *E. coli*, %9.5'u *P. aeruginosa*, %11.9'u *S. aureus*, %4.7'si *S. pneumoniae* ve %2.3'ü *Enterococcus faecalis* olarak belirlenmiştir. Ek olarak, beş olguda (%11.9) bakteri ile birlikte mantar enfeksiyonu da bulunmuştur⁽¹⁰⁾.

Çalışmamızda, hastanemizde Mart 2020 ve Şubat 2021 tarihleri arasında COVID-19 nedeni ile takip edilen 5.753 hastadan alt solunum yolu örneklerinde bakteriyel üreme olan 315 (%5.5) hasta incelenmiş, bu hastaların 124'ü (%39.3) yaşamını yitirmiştir.

Hastalarımızda Gram-negatif bakteriler arasında en çok *A. baumannii* (%47.8) üremesi saptanmıştır. Pandemi öncesinde de hastanemiz yoğun bakım hastalarının solunum yolu örneklerinde en çok *A. baumannii* (%38.8) üremesi görülmüştür. Bu durum hastanemiz yoğun bakım biriminde bir *A. baumannii* kolonizasyonunu gösterse de pandemi öncesi yoğunluğun %38.8'den pandemi döneminde COVID-19 hastalarında %47.8'e çıkması dikkat çekici bulunmuştur. En önemli nozokomial enfeksiyon etkenlerinden olan *A. baumannii* enfeksiyonları özellikle bazı durumlarda artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu durumlar çevrenin veya kullanılan materyallerin önceden mikroorganizma ile kontamine olması, hastanın ileri yaşta olması, uzun süre hastanede yatış, hastanın entübe olması, cerrahi ve invaziv girişimler, altta yatan hastalık varlığı, sekonder enfeksiyon varlığı, uzun süre antibiyotik kullanımı olarak özetlenmiştir⁽¹⁴⁾. COVID-19 hastalarında da bu yoğunluğun artma nedeni viral patogeneze, kullanılan profilaktik antibiyotikler, kullanılan kortizol gibi ilaçlar, mekanik ventilatöre bağlı olma ve hastanede kalış süresinin uzaması gibi faktörlerden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. *A. baumannii* suşlarına ait antibiyotik duyarlılığı incelendiğinde, pandemi öncesine göre amikasin (%88.5), gentamisin (%94.2), piperasilin-tazobaktam (%98.6) direnç yüzdesinde artış gözlenirken, meropenem (%98.6) ve seftazidim (%98.6) direnç yüzdesinde değişiklik gözlenmemiştir. Karbapenem grubu antibiyotikler, *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmasına rağmen, karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının oranı giderek arttığı bildirilmiştir⁽¹⁵⁾. *A. baumannii*'de hem oranın hem de direncin artma nedeni COVID-19'un primer patogenezinin kaynaklı hastanede kalış süresinin artması ve mekanik ventilasyon gereksiniminin olması nedeniyle olabileceğini bize düşündürmüştür.

Hastalarımızda belirlediğimiz diğer Gram-negatif bakteriler ise *K. pneumoniae* (%13.4), *P. aeruginosa* (%12.0), *B. cepacia* (%7.9), *E. coli* (%4.5), *S. maltophilia*

(%2.7) ve *S. paucimobilis* (%1.0) olarak sıralanmıştır. Pandemi öncesinde ise bu sıralama, *K. pneumoniae* (%23.2), *P. aeruginosa* (%13.9), *E. coli* (%8.3), *Proteus spp.* (%2.1), *B. cepacia* (%0.9) ve *Enterobacter spp.* (%1.7) olarak belirlenmiştir. Bu veriler arasında dikkat çekici olan ise pandemi öncesine göre COVID-19 hastalarında *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* oranlarının azalması; *B. cepacia* oranının artmasıdır. *B. cepacia*, intrensek olarak birçok antimikrobiyal ajana dirençli bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. Genellikle sağlıklı insanlarda morbidite ve mortalite oranları çok düşüktür ve çok ender enfeksiyona neden olmuştur. Bağışıklık sistemi baskılanmış, ek kronik hastalığı bulunan, primer immün yetmezlikli, onkolojik ve kistik fibrozisli gibi riskli hastalarda üriner sistem enfeksiyonu, peritonit, bakteriyemi/sepsis, osteomyelit, menenjit ve pnömoni gibi yaşamı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlara neden olmuştur⁽¹⁶⁾. Pandemi öncesine göre kültürde üreme oranı artan *B. cepacia* için konusu geçen bu risk faktörleri arasına COVID-19'lu hastaların da eklenmesi sonuç olarak düşünülmüştür. Yaşamını kaybeden hastalar arasında en çok görülen sekonder enfeksiyon etkenleri *B. cepacia* (%78.3), *S. paucimobilis* (%66.7), *S. maltophilia* (%50.0) şeklinde sıralanırken bu bakterilerin hastaların ölümleri ile direk ilişkili olduğu şeklinde yorum yapmak doğru olmamakla birlikte, direkt ilişki kurmak için daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerekliliği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, *A. baumannii* dışındaki diğer en sık rastlanan Gram-negatif etkenlerde antibiyotik direncinde pandemi öncesi döneme göre genel olarak bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum COVID-19 tanılı hastaların bazılarında hastaneye ilk başvurusunda bile yoğun bakım gereksinimi ve solunum desteği gerektirmesi nedeniyle uzun süreli veya geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine maruz kalmaması ve gelişen sekonder bakteriyel enfeksiyonlarda direnç oranlarının görece daha düşük olması şeklinde açıklanabilir. Ayrıca, bu hastaların hastane kökenli suşlarla mı yoksa toplumsal kökenli suşlarla mı enfekte olduğu irdelenmesi gereken bir durumdur.

Gram-pozitif bakteriler arasında hastalarımızda en sık hem pandemi öncesi (%6.2) hem de sonrası (%4.5) *S. aureus* üremesi gözlemlenmiştir. *mecA* ve *mecC* geninin ekspresyonu *S. aureus*'ta metisilin

direnci olarak karşımıza çıkmakta ve MRSA (metisilin rezistant *S. aureus*) olarak adlandırılmaktadır. Bu gen, PBP2a proteinini kodlayarak metisilin, naftisin, oksasilin ve sefalosporinlere karşı dirence neden olmaktadır⁽¹⁷⁾. Oksasilin dirençli *S. aureus*'ların çoğu *mecA* pozitifdir, ancak bazı *mecC* pozitif izolatlar gözden kaçabilmektedir⁽¹⁸⁾. Çalışmamızda oksasilin direnci pandemi öncesinde %37.9 iken, pandemi sonrasında %23.1 olarak saptanmıştır. Uzun süre yoğun bakımda kalmanın, MRSA enfeksiyonuna yakalanma olasılığını yaklaşık 2.5-4 kat artırabileceğini gösterilmiştir⁽¹⁹⁾. Ayrıca, MRSA enfeksiyonlarının yoğun bakım hastalarında önemli bir mortalite nedeni olduğu bildirilmiştir⁽¹⁹⁾. Ancak, çalışmamızdaki MRSA varlığı genetik analizler ile doğrulanmalıdır. İkinci sıklıkta görülen Gram-pozitif bakteri ise pandemi öncesi *S. pneumoniae* (%2.1) iken, pandemi döneminde daha çok *Enterococcus* spp. (%2.1) olarak belirlenmiştir. Toplum kökenli pnömoni etkenlerinden en sık olarak karşımıza çıkan *S. pneumoniae*'dir⁽²⁰⁾. Pandemi döneminde bu sıklığın azalıp yerine *Enterococcus* spp. üremesi dikkatimizi çekmiştir. Enterokoklar gastrointestinal sistem florasında bulunan mikroorganizmalar olmasına rağmen, son zamanlarda önemli bir hastane enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkmıştır⁽²¹⁾. COVID-19 hastalığı da hastaların yoğun bakımda kalış süresini uzattığı için *Enterococcus* spp. üremesinin artmasının nedeni olarak bize düşündürmüştür.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Bunlardan biri, uzun süre yoğun bakımda kalan hastalarda gelişen sekonder enfeksiyonların daha çok hastane kaynaklı olmasından dolayı bu veriler yalnızca hastanemizin nozokomiyal enfeksiyon etkenlerini yansıtmış olabileceğidir. Bunun için çok merkezden elde edilen verilerin birleştirilip yorumlanması gerekmektedir. Ayrıca, pandemi yoğunluğu nedeni ile eşzamanlı olarak COVID-19 hastası olmayan yoğun bakım hastalarından kontrol grubu oluşturulamamıştır. Bir diğer sınırlama ise sekonder pnömoni etkenlerinden yalnızca bakterilerin incelenmesi; virüs ve mantar etkenlerinin çalışmaya dâhil edilmemesidir. Tüm mikroorganizmaların incelendiği geniş çaplı daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda, hastaların klinik verilerine, ne kadar süre antibiyotik tedavisi aldığına ve hastaların bu tedavilere ne derece yanıt verdiği

dair bilgilere ulaşılamamıştır. Bu verilerin de izlendiği prospektif bir çalışma daha yapılması gereksiz antibiyotik kullanımı açısından çok daha kıymetli veriler sunacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamız yoğun bakımda olan COVID-19 hastalarında gelişen ikincil bakteriyel enfeksiyonları ve direnç paternlerini göstermektedir. Çoklu ilaca dirençli bakteriler, morbidite ve mortalitenin artmasına neden olur. Bu nedenle antibiyotik tedavisine duyulan gereksinim çabucak değerlendirilmeli ve uygun olmadığında kesilmelidir. Nozokomiyal enfeksiyonların uygun kontrolünün sağlanması ile COVID-19 hastalarında sekonder bakteriyel enfeksiyon gelişiminin önlenmesi ve bu dirençli türlerin yayılmasını sınırlamak önemlidir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.02.2021 tarih ve 2021/12 No.lu karar) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Niğde Ömer Halisdemir University, Noninvasive Clinical Research Ethics Committee (02.11.2021; 2021/12).

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

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic. [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019]. (Erişim tarihi:11.02.2021).
2. Zhang H, Zhang Y, Wu J, et al. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1958-64. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1812437>
3. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 Interim Guidance - May 2020. [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-covid-19]. (Erişim tarihi: 12.02.2021).

4. Rawson TM, Moore LS, Zhu N, et al. Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin Infect Dis*. 2020;71(9):2459-68. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530>
5. Saleem Z, Godman B, Hassali MA, Hashmi FK, Azhar F, Rehman IU. Point prevalence surveys of health-care-associated infections: a systematic review. *Pathog Glob Health*. 2019;113(4):191-205. <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1632070>
6. Vincent JL, Sakr Y, Singer M, et al. Prevalence and outcomes of infection among patients in intensive care units in 2017. *JAMA*. 2020;323(15):1478-87. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2717>
7. Lai CC, Wang CY, Hsueh PR. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(4):505-12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.05.013>
8. Sharifipour E, Shams S, Esmkhani M, et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1-7. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05374-z>
9. 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)
10. Ramadan HKA, Mahmoud MA, Aburahma MZ, et al. Predictors of severity and co-infection resistance profile in COVID-19 patients: First report from upper Egypt. *Infect Drug Resist*. 2020;13:3409-22. <https://doi.org/10.2147/idr.s272605>
11. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020;8(5):475-81. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30079-5)
12. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-62. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3)
13. Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah NH, Brown I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA*. 2020;323(20):2085-6. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6266>
14. Dal T, Dal MS, Ağır İ. *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri: Literatürün gözden geçirilmesi. *Van Tıp Derg*. 2012;19(3):137-48.
15. Şenol A, Balın ŞÖ. Yoğun bakım üniteleri'nde sık görülen enfeksiyonlar, Gram-negatif mikroorganizmalar, antibiyotik direnci. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2021;16(1):35-9. <https://doi.org/10.17517/ksutfd.671762>
16. Baylan O. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda sıklıkla saptanan bir fırsatçı patojen: *Burkholderia cepacia* kompleksi. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(2):304-18.
17. Eraksoy H. Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics*. 2011;4(1):1-14.
18. Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br J Anaesth*. 2004;92(1):121-30. <https://doi.org/10.1093/bja/ae008>
19. Thompson DS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a general intensive care unit. *J R Soc Med*. 2004;97(11):521-6. <https://doi.org/10.1258/jrsm.97.11.521>
20. Kulu Öztürk M, Karlıdağ GE, Çelik GA, Devci F. Hastaneye yatış gerektiren toplum kökenli pnömoni olgularında mortalite oranı ve etkileyen faktörler. *Tıp Fakültesi Klinikleri*. 2021;4(1):31-8. https://doi.org/10.17932/IAU.TFK.2018.008/tfk_v04i1004
21. Çelik C, Taşkın-Kafa AH, Hasbek M, Büyüktuna SA. Kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinde antimikrobiyal direnç: Tek merkez değerlendirmesi. *Klimik Derg*. 2021;34(1):37-41. <https://doi.org/10.36519/kd.2021.07>

İzmir İlinde Gebelerde Sitomegalovirüs (CMV) IgG ve IgM Antikorlarının Seroprevalansı: CMV IgG Avidite Testlerinin Analizi

Seroprevalence of Cytomegalovirus (CMV) IgG and IgM Antibodies in Pregnant Women in Izmir: An Analysis of CMV IgG Avidity Tests

Bilal Olcay Peker*^{ORCID}, Tuba Müderris**^{ORCID}, Süreyya Gül Yurtsever**^{ORCID}, Selçuk Kaya**^{ORCID}

* İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

** İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Peker BO, Müderris T, Yurtsever SG, Kaya S. İzmir ilinde gebelerde sitomegalovirüs (CMV) IgG ve IgM antikorlarının seroprevalansı: CMV IgG avidite testlerinin analizi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):56-62.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, İzmir ilinde gebelerde sitomegalovirüs (CMV) seroprevalansını belirlemek ve CMV IgG antikor düzeyleri ile birlikte CMV avidite test sonuçlarını yıllara göre değerlendirmek amaçlandı.

Yöntem: Ocak 2016-Aralık 2019 tarihleri arasında, üniversite hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarında 20. gebelik haftası ve altındaki gebelerin (≥ 18 yaş) serum örneklerinde kemiluminesan mikropartikül immunoassay yöntemi ile çalışılan CMV IgM, CMV IgG ve CMV IgG avidite test sonuçları retrospektif olarak analiz edildi.

Bulgular: Çalışmaya dâhil edilen 3.062 gebenin yaş ortalaması 28.57 ± 5.96 yıl (aralık: 18-48 yaş) idi. CMV IgG ve IgM seropozitiflik oranı sırasıyla %94.22 ($n=2885/3062$) ve %1.37 ($n=42$) olarak bulundu. CMV IgM pozitif olan üç hastada CMV IgG avidite indeksi düşük belirlendi (%7.14, $n=3$). CMV seropozitif gebelerin IgG antikor düzeyi ve yaşları arasında zayıf bir korelasyon ilişkisi saptandı ($p=0.041$, $\rho=0.038$, $r^2=0.001$). CMV IgG seropozitiflik oranı yıllara göre değişmekle birlikte, 2016 yılında (%83.22) en düşük düzeyde, CMV IgM pozitiflik oranı ise 2019 yılında (%2.13) en yüksek düzeyde saptandı. CMV seropozitifliği, 38-48 yaş arası gebelerde en yüksek düzeyde saptandı ve yaşa göre bu grupta CMV IgG düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p=0.004$).

Sonuç: Çalışmada, İzmir ilindeki gebelerde CMV IgG seroprevalansı (%94.22) yüksek seyretmektedir, ancak seronegatif ve CMV IgM pozitif gebelerin de varlığı konjenital CMV enfeksiyonu açısından riskli gebeliklerin devam ettiğini göstermektedir. Etkin bir ulusal süreyans ağıının oluşturulmasıyla seroprevalans çalışmalarının kapsamının genişletilerek bölgelere ve yıllara göre sürekli olarak güncellenen verilerle gebe takibinde ek tedbirlerin uygulanması sağlanabilir.

Anahtar kelimeler: CMV, gebelik, CMV avidite

ABSTRACT

Objective: We aimed to determine the seroprevalence of cytomegalovirus (CMV) in pregnant women in Izmir province and to evaluate CMV IgG antibody levels and CMV avidity test results according to years.

Methods: CMV IgM, CMV IgG and CMV IgG avidity tests were performed using the chemiluminescence microparticle immunoassay method in serum samples from pregnant women (≥ 18 years, ≤ 20 gestational week) at the microbiology laboratory of university hospital from January 2016 to December 2019 and results were retrospectively analyzed.

Results: The mean age of 3062 pregnant women included in the study was 28.57 ± 5.96 (range: 18 - 48 years) years. The CMV IgG and IgM seropositivity rates were 94.22% ($n=2885$) and 1.37% ($n=42$), respectively. CMV IgG avidity index was low in three patients with CMV IgM positive (7.14%, $n=3$). A weak correlation was found between IgG antibody level and age of CMV seropositive pregnant women ($p=0.041$, $\rho=0.038$, $r^2=0.001$). Although the rate of CMV IgG seropositivity changes according to the year, it was lowest (83.22%) in 2016, and CMV IgM positivity was highest in 2019 (2.13%). CMV seropositivity was highest in pregnant women aged 38 - 48 years and CMV IgG levels were significantly lower in this group according to age ($p=0.004$).

Conclusion: In the study, CMV IgG seroprevalence (94.22%) is high among pregnant women in Izmir, but the presence of seronegative and CMV IgM positive pregnant women show that there are still risk pregnancies in terms of congenital CMV infection. With the establishment of an effective national surveillance network, additional measures can be applied in the follow-up of pregnant women by expanding the scope of seroprevalence studies with continuously updated data by region and year.

Keywords: CMV, pregnancy, CMV avidity

Alındığı tarih / Received:
30.11.2021 / 30.November.2021
Kabul tarihi / Accepted:
28.12.2021 / 28.December.2021
Erken çevrimiçi / First Published:
31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

B. O. Peker 0000-0001-8735-2962
T. Müderris 0000-0002-8538-5864
S. G. Yurtsever 0000-0002-4421-230X
S. Kaya 0000-0002-8637-6345

✉ olcaypeker@hotmail.com

GİRİŞ

Konjenital sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu gebelik sırasında annede primer veya reaktive CMV enfeksiyonunun transplasental yolla fetusa geçişi ile meydana gelmektedir⁽¹⁾. Konjenital CMV enfeksiyonu, fetus kaybına, anomalilere ve doğum sonrası klinik semptomlara neden olabildiği için önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak görülmektedir⁽²⁾. Konjenital olarak enfekte olmuş bebeklerin yaklaşık %10-%15'i doğumda hastalık belirti ve semptomlarına sahiptir ve bunların yaklaşık yarısında uzun dönem sekeller görülmektedir⁽³⁾. CMV için maternal seroprevalansın düşük olduğu endüstrileşmiş toplumlarda, konjenital CMV prevalansı canlı doğumların %0.6-%0.7'si kadardır⁽⁴⁾. Ülkemizde ise konjenital CMV seroprevalansı, %0.2-%1.91 olarak bildirilmiştir^(5,6).

CMV antikorlarının taramasında CMV immünoglobulin G (IgG), immünoglobulin M (IgM) ve IgG avidite testleri kullanılmaktadır. IgM tespiti primer enfeksiyon için hassas bir belirteç olmasına rağmen, enfeksiyon sonrası uzun süre tespit edilebilir. Bu durumda primer enfeksiyonun, reaktivasyon veya reenfeksiyondan ayırımında IgG avidite testi yol gösterici olabilir. Gebeliğin ilk trimesterindeki düşük IgG avidite indeksi son 3-4 ay içinde geçirilmiş primer enfeksiyon için güçlü bir göstergedir ve konjenital CMV enfeksiyonu açısından gebe takibinde önemlidir⁽¹⁾. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan IgG avidite testi, CMV enfeksiyonu için maternal taramada dünya genelinde kullanılmaktadır^(1,7).

Gebelerde yapılan CMV IgG seroprevalans çalışmalarında ise Türkiye %97.7 ile yüksek seroprevalanslı ülkeler arasında yer almaktadır⁽⁸⁾. Yüksek seroprevalanslı toplumlarda gebelerde konjenital CMV olgularının tespiti ve takibi önemlidir. Çalışmamızda, hastanemize başvuran gebelerde CMV IgM, CMV IgG ve CMV IgG avidite test sonuçlarının restrospektif olarak değerlendirmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (23.12.2021 tarih ve 0566 No.lu karar) onaylanmıştır.

Çalışmamızda, kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran 20. gebelik haftası ve altındaki gebelerde (≥ 18 yaş) Ocak 2016-Aralık 2019 yıllarına ait CMV serolojileri retrospektif olarak analiz edildi. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen serum örneklerinde CMV IgM, CMV IgG ve CMV IgG avidite (Abbott, Almanya) testleri kemiluminesan mikropartikül immunoassay yöntemi ile Architec plus i2000SR (Abbott, ABD) cihazında çalışıldı. CMV IgM testi; < 0.85 indeks (S/CO) nonreaktif, ≥ 1.00 indeks (S/CO) reaktif, $0.85-1$ indeks (S/CO) arası grayzone olarak değerlendirildi. CMV IgG testi; < 6.0 AU/mL nonreaktif ve ≥ 6.0 AU/mL reaktif olarak değerlendirildi. CMV IgG ve CMV IgM testleri reaktif bulunan hastalara, CMV IgG avidite testi çalışıldı. CMV IgG avidite testi; $< \%50.0$ düşük avidite, $\%50.0-59.9$ arası grayzone, $\geq \%60.0$ yüksek avidite olarak değerlendirildi. Hastalar yaş gruplarına göre üç grupta incelendi. Grup 1; 18-27 yaş arasındaki hastalardan, Grup 2; 28-37 yaş arasındaki hastalardan, Grup 3 ise; 38-48 yaş arasındaki hastalardan oluşmakta idi. Hastaların demografik ve laboratuvar bilgilerine hastane veri sisteminden ulaşıldı.

İstatistik analiz IBM SPSS istatistik 23 (SPSS Inc., Şikago, IL, ABD) programı ile yapıldı. Normal dağılıma sahip değerler, bağımsız örneklem için T-test metodu kullanılarak analiz edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar kategorik değişkenler için Fisher kesinlik testi ve sürekli değişkenler için Kruskal-Wallis testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma (SD), sayı (n), ve yüzde oran (%) olarak verildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

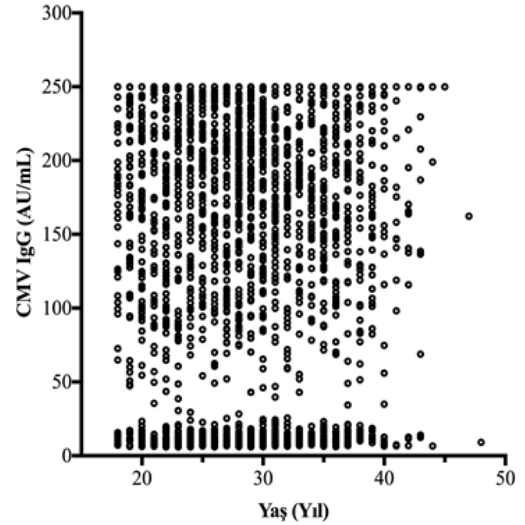
Çalışmada, 3062 gebeye ait CMV IgG ve IgM test sonuçları analiz edildi. Çalışmaya alınan gebelerin

yaş ortalaması 28.57 ± 5.96 (aralık: 18-48 yaş) idi. CMV IgG seropozitiflik oranı %94.22 ($n=2885/3062$) olarak bulundu. CMV IgG pozitif gebelerin yaş ortalaması 28.62 ± 5.97 (aralık: 18-48 yaş), CMV IgG negatif gebelerin yaş ortalaması 27.83 ± 5.76 (aralık: 18-43 yaş) olarak bulundu. CMV IgG pozitif ve negatif gebelerin yaş ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.87$, t test).

CMV IgM seropozitiflik oranı %1.37 ($n=42/3062$) olarak bulundu. Çalışmamızda 30 gebede CMV IgM pozitif ve CMV IgG negatif olarak saptandı. Bu gebelerin üç hafta sonraki test sonuçlarında CMV IgG serokonversiyonu izlenmedi. Neticede bu sonuçlar yanlış CMV IgM pozitif test sonucu olarak değerlendirildi. CMV IgM pozitif olan üç hastada CMV IgG avidite indeksi düşük düzeyde tespit edildi (%7.14, $n=3/42$). Bu hastaların CMV IgG antikor düzeyleri 7.41-13.6 AU/mL arasında ölçüldü. CMV IgG avidite indeksi yüksek olan gebelerin yaş ortalaması 27.51 ± 5.25 (aralık: 19-41 yaş) olarak saptandı. CMV IgG avidite indeksi yüksek ve düşük gebelerin yaş ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.67$, Fisher kesinlik testi)

CMV IgG seropozitiflik oranı yıllara göre değerlendirildiğinde, 2016 yılında (%83.22) en düşük düzeydedir. CMV IgM pozitiflik oranı yıllara göre değerlendirildiğinde, 2019 yılında (%2.13) en yüksek düzeydedir. CMV IgG avidite indeksi düşük düzeyde saptanan olguların tamamı 2016 yılına ait hastalardan oluşmakta idi (Tablo 1).

CMV seropozitif gebelerin IgG antikor düzeyi ve yaşları arasında zayıf bir korelasyon ilişkisi saptandı ($p=0.041$, $\rho=0.038$ $r^2=0.001$, Spearman korelasyon analizi). Şekil 1'de CMV IgG düzeylerinin yaşa bağlı dağılım grafiği verilmiştir. CMV IgG pozitiflik oranları yaş gruplarına göre (grup 1, 2 ve 3) incelendiğinde sırasıyla; %93.28 ($n=1319/1414$), %94.89 ($n=1338/1410$), %95.79 ($n=228/238$) olarak saptandı ($p=0.1$ Kruskal-Wallis test). CMV seroprevalansı, 38-48 yaş arası gebelerde en yüksek düzeyde saptandı ve yaşa göre bu grupta CMV IgG düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p=0.004$, Kruskal-Wallis test) (Tablo 2).



Şekil 1. CMV IgG düzeylerinin yaşa bağlı dağılımı

Tablo 1. Gebelerde CMV IgM, IgG ve IgG avidite test sonuçlarının yıllara göre sayı ve yüzde dağılımları

	CMV IgM		CMV IgG		CMV IgG Avidite	
	Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Yüksek n (%)	Düşük n (%)
2016	9 (1.04)	855 (98.96)	719 (83.22)	145 (16.78)	6 (66.7)	3 (33.3)
2017	12 (1.27)	932 (98.73)	933 (98.84)	11 (1.16)	12 (100)	-
2018	8 (1.24)	636 (98.76)	634 (98.45)	10 (1.55)	8 (100)	-
2019	13 (2.13)	596 (97.87)	598 (98.20)	11 (1.80)	13 (100)	-
Toplam (%)*	42 (1.37)	3020 (98.63)	2885 (94.22)	177 (5.78)	39 (92.85)	3 (7.15)

*Her bir test grubu içerisindeki toplam test sayıları ve yüzde oranlarını içermektedir.

Tablo 2. Yaş gruplarına göre gebelerde CMV IgG pozitiflik oranları ve ölçülen değerler

	Grup 1 (18–27 Yaş) n=1414	Grup 2 (28–37 Yaş) n=1410	Grup 3 (38–48 yaş) n=238	p değeri
CMV IgG pozitiflik %	%93.28	%94.89	%95.79	0.1
Ortalama	173.5	153.1	151.6*	0.004
SD %95 CI (AU/mL)	86.11 (162.2–184.7)	95.09 (148–158.2)	96.2 (146.4–156.8)	

*Yaş grupları içinde Grup 3 için ortalama CMV IgG antikor düzeyi diğer iki yaş grubuna göre anlamlı olarak farklıdır.

TARTIŞMA

Konjenital CMV en yaygın izlenen konjenital viral enfeksiyon olmakla birlikte, primer CMV enfeksiyonu ile intrauterin CMV bulaşı arasında güçlü bir bağlantı vardır⁽⁹⁾. Gebelerde konsepsiyon sonrası primer CMV enfeksiyonu geçiren annelerden doğan bebeklerde konjenital CMV enfeksiyonu riski (%40), öncesinde CMV seropozitif olan annelerde izlenen primer olmayan (reaktivasyon veya reenfeksiyon sonrası) CMV enfeksiyonu sonrası doğan bebeklerdeki riskten (%1) daha yüksektir^(4,10). Primer konjenital CMV enfeksiyonu sonrası geç dönem gebelikte intrauterin bulaş oranları artarken, erken dönem gebelikte bulaş sonrası fetal anomali riski daha yüksektir⁽¹¹⁾. Seroprevalans çalışmalarında yüksek oranlar tespit edilmesine rağmen gebelerde konjenital CMV enfeksiyonunun taranması için evrensel olarak kabul edilmiş kılavuzlar mevcut değildir ve rutin olarak önerilmemektedir⁽¹⁾. Ancak, mevcut tanı testleri gebelerdeki immün durumun belirlenmesinde, sonuçlara göre gebe takibinde uygulanacak tanı ve tedavi uygulamalarına katkı sağlamaktadır. Çalışmamızda, İzmir ilindeki gebelerin CMV serolojisine ait güncel oranlarını sunmak amacıyla CMV IgM, CMV IgG ve CMV IgG avidite test sonuçları retrospektif olarak analiz edildi.

Türkiye CMV seroprevalansının yüksek olduğu ülkeler arasındadır ve yapılan çalışmalarda bu oran %90'ın üzerindedir⁽¹²⁾. Ülkemizdeki gebeler üzerinde yapılan 22 çalışmayı kapsayan bir meta-analizde CMV IgG seropozitiflik oranları %84.10-%100 arasında değişmektedir⁽⁸⁾. İzmir ilinde gebelerde CMV IgG seropozitiflik oranları mevcut iki çalışmada %98.9

ve %99.04 olarak bildirilmiştir^(13,14). Çalışmamızda, gebelerde CMV IgG seroprevalansı %94.22 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda, örneklem büyüklüğünün bölgemizde yapılan diğer çalışmalara oranla daha büyük olması, sonuçlarımızdaki nispeten daha düşük bir CMV IgG seroprevalans oranının sebebi olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda 2016 yılındaki verilerde bu oran diğer yıllara göre daha düşük tespit edilmiştir ve son üç yıldaki bulgular önceki iki çalışma ile uyumludur. Çalışma grubumuzun tamamı için saptadığımız oran 2016 yılı verileri ile ilişkili olarak daha düşük saptanmıştır.

Çetinkaya'nın⁽⁸⁾ meta-analiz çalışmasında ülkemiz için gebelerdeki CMV IgM antikor pozitiflik oranı %1.30 olarak tespit edilmiştir. Ülkemiz genelinde gebelerde CMV IgM pozitiflik oranları yıllara ve şehirlere göre değişmekle birlikte CMV IgM seropozitifliği %0.12-%3.2 arasında saptanmıştır⁽⁸⁾. Uysal ve ark.⁽¹⁵⁾ İzmir ilindeki gebelerde 2001-2008 yılları için CMV IgM pozitiflik oranını %0.18 olarak bildirmişlerdir. İzmir ilinde yapılan daha yakın tarihli verilerin sunulduğu Varıcı Balcı ve ark.'nın⁽¹³⁾ çalışmasında, %1.44, Şirin ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ çalışmasında ise %1.54'tür. Çalışmamızda, gebelerde CMV IgM seropozitifliği bu iki çalışmadaki oranlara yakın olarak tespit edilmiştir.

CMV IgG seropozitifliği ülkelerin gelişmişlik durumu ve yaş ile ilişkilidir. Düşük sosyoekonomik toplumlarda ve yaş ilerledikçe CMV ile karşılaşma olasılığı artmaktadır⁽¹⁶⁾. Gebelerde CMV seroprevalans oranları ile ilişkili olarak toplum sağlığı açısından hala önemli bir yeri olan konjenital CMV enfeksiyonlarının görülme sıklıkları da toplumlara ve

yıllara göre dinamik olarak değişmektedir. Konjenital CMV enfeksiyonu gebelik öncesi CMV IgG seropozitif kadınlarda da izlenmektedir ve yüksek seroprevalanslı toplumlarda konjenital CMV enfeksiyonu oranları da yüksek olmaktadır⁽²⁾. Seropozitif gebelerde az sayıda olguda fetusa CMV bulaşı bildirilse de bu olgular viral reaktivasyon veya farklı bir CMV suşu ile reenfeksiyon olarak tanımlanan primer olmayan CMV enfeksiyonları olarak izlenmektedir. Bu gözlemlerde, önceden var olan antikorların viremi kontrolü sağlayabileceği düşünülmekte ve primer enfeksiyonla kıyaslandığında bulaş hızının daha düşük olmakla birlikte, konjenital CMV enfeksiyonuna karşı koruma sağlıyor gibi görünmektedir^(7,17). Yapılan seroprevalans çalışmaları ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da yıllar içerisinde gebelerde hem CMV IgG hem de CMV IgM seropozitiflik oranları değişmektedir⁽⁸⁾. Ancak, çalışmamızda tanısı konan konjenital CMV olgularına ait bir veri bulunmamaktadır. İzmir ilinde güncel seropozitiflik oranları bu etkenler göz önünde bulundurularak daha dikkatli yorumlanmalıdır.

CMV IgG avidite sonuçları yorumlanırken dikkat edilmesi gereken bir diğer konu ise CMV IgG antikor düzeyleridir. Çünkü düşük düzey IgG'ye sahip serum numunelerinde avidite indeks sonuçları düşük ölçülebilir^(1,2,18,19). Fakat bu şüpheli test sonuçlarını ayırt edebilecek girişimsel olmayan bir metod bulunmamaktadır. Çalışmamızda dahil edilen yıllar içinde 42 (%1.37) gebede CMV IgG avidite testi çalışıldı. CMV IgG avidite indeksi üç (%7.14) gebede düşük düzeyde saptandı. Çalışmamızda düşük avidite indeksi saptanan numunelerde IgG düzeyleri 7.41-13.6AU/mL arasında tespit edilmiştir. Benzer durumda CMV IgM titrasyonları ve avidite indeksi arasında korelasyon bulunmaktadır. Özellikle ilk trimesterde izlenen yüksek CMV IgM titreleri primer konjenital CMV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmektedir⁽²⁰⁾. Viral reaktivasyon veya farklı bir CMV suşu ile reenfeksiyon sonucunda da IgM üretilebilmektedir ancak bazı kişilerde birincil enfeksiyonu takiben uzun süreli IgM kalıcılığı (bazen bir yıldan fazla) görülebilir. Bu nedenle CMV IgM'in tespiti primer enfeksiyonu tanımlamada yüksek duyarlılığa ve düşük özgüllüğe sahiptir^(7,17). CMV'nin seroloji profilleri elbette bir bütün halinde değerlendirilmelidir ancak avidite test sonuçları yanında IgM antikor düzeyleri de gebede olası CMV enfeksiyonu hakkında fikir sunabilmektedir.

Yaş ile birlikte CMV IgG seropozitiflik oranları artmaktadır⁽²¹⁾. Gülseren ve ark.'nın⁽²²⁾ çalışmasında, yaş ve CMV IgG antikor düzeyleri arasında pozitif yönlü bir korelasyon tespit edilmiştir. Toplam immünglobulin düzeylerinin yaşlanma ile birlikte düştüğü bilinmektedir ancak yaşlanma sırasında CMV'ye karşı hümorale bağışıklık tepkisi istikrarlı ve belirgin bir şekilde artmaktadır⁽²³⁾. Çalışmamızda, CMV IgG antikor düzeyleri ile yaş arasında zayıf düzey korelasyon tespit ettik. Yaş grupları arasında, CMV IgG düzeylerinin de anlamlı olarak birbirinden farklılık gösterdiğini saptadık, ancak 38-48 yaş grubunda daha düşük IgG düzeyleri saptadık. Nispeten daha düşük CMV IgG seropozitiflik oranı ilk iki yaş grubunda görülsede bütün yaş gruplarında oranlar yüksekti, ancak oranların dağılımı açısından aralarında anlamlı bir fark saptanmadı. Alaçam ve ark.'nın⁽²⁴⁾ çalışmasında da bütün yaş gruplarında CMV IgG seropozitifliği yüksek oranda bildirilmiştir fakat yaş guruplarına göre oranlar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Toplumumuzda CMV IgG seropozitifliği yüksektir, ancak CMV açısından seronegatif gebeler primer CMV enfeksiyonu açısından risk oluşturmaktadır. Dolayısıyla gebelik öncesi CMV seroimmün durumu bilinmeyen ve seronegatif olan gebeler tespit edilerek primer CMV enfeksiyonunu önlemek adına koruyucu önlemlerin alınması sağlanabilir. Bu durumda, CMV IgG seronegatif gebelere diğer bireylerin vücut sıvılarıyla (özellikle okul öncesi çocuklar) doğrudan temastan kaçınmak ve sık sık el yıkamak gibi hijyen önlemlerinin alınması konusunda danışmanlık verilebilir⁽⁷⁾.

Çalışmamız laboratuvar verilerini içermektedir ve hastalara ait klinik veriler dahil edilmemiştir. Bu nedenle CMV IgG avidite indeksi düşük tespit edilen ve takibe alınan gebelerde girişimsel tanı uygulamasına (amniyoniyo sentez, kordosentez ve ultrasonografi) ait veriler olamadığı için fetüs üzerine mortalite ve morbidite etkisinin değerlendirilememesi çalışmamızın kısıtlılığını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, ülke genelinde gebelerde CMV seroprevalansı yüksek olsa da yıllara ve şehirlere göre oranlar dinamik olarak değişmektedir. İzmir ilindeki gebelerde CMV IgG seroprevalansı yüksek seyretmektedir ancak seronegatif ve CMV IgM pozitif gebelerin de varlığı konjenital CMV

enfeksiyonu açısından riskli gebeliklerin devam ettiğini göstermektedir. Etkin bir ulusal sürveyans ağının oluşturulmasıyla seroprevalans çalışmalarının kapsamının genişletilerek bölgelere ve yıllara göre sürekli olarak güncellenen verilerle gebe takibinde ek tedbirlerin uygulanması sağlanabilir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (23.12.2021 tarih ve 0566 No.lu karar) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of İzmir Kâtip Çelebi University, Noninvasive Clinical Research Ethics Committee (12.23.2021; 0566).

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

KAYNAKLAR

1. Lazzarotto T, Blázquez-Gamero D, Delforge M-L, et al. Congenital cytomegalovirus infection: A narrative review of the issues in screening and management from a panel of European experts. *Front Pediatr*. 2020;8:13. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00013>
2. Chiopris G, Veronese P, Cusenza F, et al. Congenital cytomegalovirus infection: Update on diagnosis and treatment. *Microorganisms*. 2020;8(10):1-17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101516>
3. Thigpen J. Congenital cytomegalovirus-history, current practice, and future opportunities. *Neonatal Netw*. 2020;39(5):293-8. <https://doi.org/10.1891/0730-0832.39.5.293>
4. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):86-102. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-12>
5. Sahiner F, Cekmez F, Cetinkaya M, et al. Congenital cytomegalovirus infections and glycoprotein B genotypes in live-born infants: a prevalence study in Turkey. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47(7):465-71. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1018316>
6. Zeytinoğlu A, Terek D, Arslan A, ve ark. Yenidoğan bebeklerin tükürük örneğinde CMV DNA varlığı ile konjenital CMV enfeksiyonunun araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2019;53(1):53-60. <https://doi.org/10.5578/mb.67724>
7. Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(10):1377-84. <https://doi.org/10.1128/CVI.00487-14>
8. Çetinkaya RA. Gebelerde sitomegalovirüs seroprevalansı ve Türkiye'nin dünyadaki seroepidemiolojik durumu; Bir meta-analiz araştırması. *Flora*. 2019;24(2):119-30. <https://doi.org/10.5578/flora.67722>
9. Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *J Clin Virol*. 2008;41(2):57-62. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.09.004>
10. Revello MG, Fabbri E, Furione M, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol*. 2011;50(4):303-7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.12.012>
11. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):522-8. <https://doi.org/10.1086/600882>
12. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2019;29:e2034. <https://doi.org/10.1002/rmv.2034>
13. Varıcı Balcı FK, Arslan A, Sertöz R, Altuğlu İ. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran gebelerde rubella ve sitomegalovirüs seroprevalansı. *Ege Tıp Derg*. 2014;53(4):179-83. <https://doi.org/10.19161/etd.344083>
14. Sirin MC, Agus N, Yilmaz N, ve ark. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella virus and cytomegalovirus among pregnant women and the importance of avidity assays. *Saudi Med J*. 2017;38(7):727-32. <https://doi.org/10.15537/smj.2017.7.18182>
15. Uysal A, Taner CE, Cüce M, et al. Cytomegalovirus and rubella seroprevalence in pregnant women in Izmir/Turkey: follow-up and results of pregnancy outcome. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286(3):605-8. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2353-z>

16. Çolak D, Mutlu D. Herpes grubu viruslar. Us D, Ergünay K, eds. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2012:509-52.
17. Şahiner F. Konjenital sitomegalovirüs enfeksiyonlarının tanı ve yönetiminde güncel yaklaşımlar ve Türkiye'deki durum. Mikrobiyol Bul. 2020;54(1):171-90. <https://doi.org/10.5578/mb.68978>
18. Faure-Bardon V, Magny J-F, Parodi M, et al. Sequelae of congenital cytomegalovirus following maternal primary infections are limited to those acquired in the first trimester of pregnancy. Clin Infect Dis. 2019;69(9):1526-32. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1128>
19. Berth M, Grangeot-Keros L, Heskia F, Dugua J-M, Vauloup-Fellous C. Analytical issues possibly affecting the performance of commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(9):1579-84. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2109-8>
20. Toriyabe K, Morikawa F, Minematsu T, Ikejiri M, Suga S, Ikeda T. Anti-cytomegalovirus immunoglobulin M titer for congenital infection in first-trimester pregnancy with primary infection: a multicenter prospective cohort study. J Perinatol. 2017;37(12):1272-7. <https://doi.org/10.1038/jp.2017.133>
21. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. Ital J Pediatr. 2017;43(1):38. <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0358-8>
22. Gülseren YD, Esenkaya Taşbent F, Özdemir M. Gebelerde sitomegalovirüs ile rubella seroprevalansının ve yaşa bağlı dağılımının araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2019;49(3):154-61. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2019.154>
23. Parry HM, Zuo J, Frumento G, et al. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. Immun Ageing. 2016;13:1. <https://doi.org/10.1186/s12979-015-0056-6>
24. Alaçam S, Bakır A, Karataş A, et al. Investigation of seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus in pregnant population in Istanbul. JAMER. 2020;5(3):19-24.

Kan Bankacılığında İyi Laboratuvar Uygulamalarına Temel Oluşturmak Üzere Kan Bağışçılarında Hepatit B Tarama Testleri İçin Kalite Kontrol Serumlarının Geliştirilmesi

Development of Quality Control Sera for Hepatitis B Screening in Blood Donors for the Establishment of Good Laboratory Practices

Fahri Yüce Ayhan^{*✉}, Memnune Selda Erensoy^{**✉}, Rüçhan Sertöz^{**✉}

* Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir, Türkiye

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

Atf/Cite as: Ayhan FY, Erensoy MS, Sertöz R. Kan bankacılığında iyi laboratuvar uygulamalarına temel oluşturmak üzere kan bağışçılarında hepatit B tarama testleri için kalite kontrol serumlarının geliştirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):63-72.

Öz

Amaç: Kan bağışçılarının transfüzyonla bulaşan enfeksiyonların mikrobiyolojik taraması güvenli kan temini açısından önemli ve gereklidir. Bu çalışmada, zorunlu tarama testlerinde HbsAg reaktivitesi gösteren bağışçı kanlarından internal kalite kontrol (İKK) serumlarının hazırlanması amaçlandı.

Yöntem: Bu amaçla Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'ne kan bağışında bulunmuş ve zorunlu tarama testlerinde saptanan HbsAg reaktivitesi nedeniyle karantinaya alınmış kanlardan plazmaları ayrıldı ve -70°C'de saklandı. HbsAg S/CO değeri yüksek (>1000) ve saptanabilir (>50 IU/ml) HBV DNA kantitasyonu bulunan plazmalar internal kalite kontrol örneği hazırlamak üzere havuzlanarak birleştirildi. Kalsiyum klorür ve trombin ile koagulasyonu sağlanan plazmadan elde edilen serum, dekstran sülfat ile muamele edildi ve bir dizi santrifügasyon işlemi uygulanarak lipid presipitasyonu sağlandı. Serum havuzundan alınan örnekler farklı sulandırım oranlarında fosfat tamponlu serum fizyolojik ile sulandırıldı. Farklı sulandırım oranları HbsAg reaktivitesi yönünden test edilerek S/CO oranlarına göre düşük reaktif, orta reaktif ve yüksek reaktif olarak üç farklı seri internal kontrol serumu kriyotüplere dağıtıldı ve donduruldu. Dondurulan İKK serumlarından farklı günlerde her seriden birer kriyotüp çözülürerek HbsAg yönünden test edildi. Bulunan S/CO değerleri Levey-Jennings grafiğine işlendi ve Westgard kurallarına göre değerlendirildi.

Bulgular: Yüksek, orta ve düşük reaktif İKK serumlarının S/CO değerlerinin istatistik analizinde ortalama sırasıyla 3323.75, 1725.57 ve 219.57 bulunurken, ortanca sırasıyla 3401.76, 1753.48 ve 217.34; standart sapma ise sırasıyla 14.93, 210.62 ve 271.19 olarak belirlendi. Değişim katsayıları ise yüksek reaktif İKK serumlarında %8.1, orta reaktif İKK serumlarında %12.2 ve düşük reaktif İKK serumlarında %7.6 olarak belirlendi.

Sonuç: ISO15189 kapsamında laboratuvarların bağımsız İKK örnekleri ile çalışması teşvik edilmektedir. Kan bağışçılarında toplanan kanlardan İKK örneklerinin hazırlanması uygun bir çözüm olarak gözükmektedir.

Anahtar kelimeler: HbsAg, kan bağışçısı, internal kalite kontrol

ABSTRACT

Objective: Microbiological screening of blood donors for agents of transfusion transmitted infections is important and necessary for ensuring the transfusion safety. The aim of this study was to prepare internal quality control (IQC) sera for HbsAg screening of blood donors by using the human plasma collected from blood donors with detectable HbsAg levels.

Methods: Quarantined fresh plasmas separated from the whole blood samples of donors with repeatedly reactive screening tests for HbsAg with high S/CO ratio (>1000) and detectable (>50IU/ml) HBV DNA were used for the preparation of IQC sera. In vitro coagulation of pooled plasma was performed by using calcium chloride and bovine thrombin. Following the removal of coagulum, dextrane sulphate was added and precipitation of lipids was carried out in a series of centrifugation processes. Samples from the sera pool were diluted with PBS and diluted samples were tested for HbsAg reactivity. Recorded S/CO ratio of IQC samples from each category was applied to Levey-Jennings control charts and evaluated according to Westgard rules.

Results: In descriptive analysis of high, medium and low reactive IQC samples the mean was found to be 3323.75, 1725.57 and 219.57; the median was determined as 3401.76, 1753.48 and 217.34; the standard deviation was calculated as 271.19, 210.62 and 14.93, respectively. Coefficients of variation for high, medium and low reactive IQC samples were determined as %8.1, %12.2 and %7.6, respectively.

Conclusion: In concordance with ISO15189 standards that suggest the use of independent run controls for immunoassays, it would be beneficial to prepare IQC samples from collected blood in blood banks.

Keywords: HbsAg, Blood Donor, Internal Quality Control

Alındığı tarih / Received:
18.11.2021 / 18.November.2021

Kabul tarihi / Accepted:
06.01.2022 / 06.January.2022

Erken çevrimiçi / First Published:
31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

F. Y. Ayhan 0000-0003-2982-0240
M. S. Erensoy 0000-0002-7052-8359
R. Sertöz 0000-0002-5321-4710

✉ yayhan@yahoo.com

GİRİŞ

Kan bağışçılarının transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar yönünden mikrobiyolojik taraması güvenli kan temini açısından önemli ve gereklidir. Ülkemizde zorunlu tarama testlerinin kapsamı hepatit B, hepatit C, AIDS ve sifiliz enfeksiyonlarına ilişkin göstergelerin araştırılması olarak belirlenmiştir. Genel anlamda, tarama testlerinin en önemli performans ölçütü geniş bir topluluk içerisindeki gerçek hastaları saptayabilmesi olarak kabul edilmektedir. Bu da testin duyarlılığının yüksek olması beklentisini yaratmaktadır. Çoğunlukla tarama testlerinde %95'den yüksek bir duyarlılık olması istenmektedir⁽¹⁾. Ancak, kan bağışçılarının serolojik taramasında kullanılan testlerde yalnızca analitik duyarlılığın yüksek olması transfüzyon güvenliği açısından yeterli değildir. Bu testlerin uygulanması sırasındaki süreçlerde kalite güvencesinin sağlanması ve sürdürülebilirliği önemli ve gereklidir.

Analitik sürecin düzgün biçimde tamamlandığını güvence altına almada önemli araçlardan birisi de kalite kontrol numuneleridir. Bunlar hasta örneklerine benzer ve belirli bir konsantrasyonda analitik madde içeren örneklerdir. Test kiti üreticileri, tedarik ettikleri test kiti ile birlikte kontrol örneklerini de sağlamaktadırlar. Ancak, tıbbi laboratuvarlar için geçerli standartları tanımlayan ISO 15189 kapsamında tıbbi laboratuvarların iç kalite kontrol (İKK) örneklerini kit tedarikçisinden bağımsız olarak sağlamaları önerilmektedir. Bu şekilde laboratuvardaki analitik sürecin daha nesnel ve gerçekçi bir biçimde değerlendirilmesi olasıdır. Bağımsız İKK örnekleri kit üreticilerinden farklı ticari kaynaklardan sağlanabilmekle birlikte, bu maliyet arttırıcı bir unsurdur. Bu açıdan laboratuvarların kendi bağımsız İKK örneklerini hazırlaması uygun bir çözüm olarak gözükmektedir^(2,3).

Kan bağışığı kabul eden kan hizmet birimlerinde tarama testlerinde reaktivite nedeniyle kullanılmayıp imha edilen bağışığı kanlarından bu testler için İKK örnekleri hazırlanması olasıdır. Bu girişim kan hizmet biriminde kalite yönetimi çerçevesinde transfüzyon güvenliğini arttırmaya yönelik bir edim olması yanında maliyet

etkinliği arttıracak bir kaynak yaratma eylemi olarak da yararlı olacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (17.04.2018 tarih ve 18-4.1/47 No.lu karar) onaylanmıştır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'ne, kan bağışığında bulunmak amacıyla başvuran ve değerlendirme sonunda uygun bulunan kişilerden kan bağışığı kabul edilerek kan bileşenleri hazırlandı. Kan bağışığı sırasında ayrılmış numunelerde zorunlu mikrobiyolojik tarama testleri kemilüminesans mikropartikül immünoassay (CMIA) yöntemiyle (Architect i2000, Abbott Laboratories, ABD) araştırıldı. Zorunlu mikrobiyolojik tarama testlerinde reaktivite saptanması nedeniyle transfüze edilemeyeceğine karar verilen ve imha edilmek üzere ayrılan kan bileşenlerinden hepatit B virüs yüzey antijeni (HBsAg) reaktivitesi saptanmış olan plazmalar çalışma amacıyla ayrıldı. HBsAg reaktivitesi yanında taranan diğer enfeksiyon etkenlerine (HIV, HCV, *Treponema pallidum*) yönelik testlerinde de reaktive saptanmış bağışığı plazmaları çalışma dışında bırakıldı.

Ayrılan plazmalar HBsAg sinyal/eşik (S/CO) ölçüm değerleri açısından kategorize edildi ve HBsAg S/CO değeri 1000 üzerinde bulunan 14 plazmadan serum havuzu hazırlanmasında kullanılmak üzere ikiye adet steril, vidalı kapaklı 50 ml hacimli polipropilen (PP) tüplere ve testlerde kullanılmak üzere beşer adet 2 ml hacimli PP kriyotüplere dağıtılarak torba üzerindeki sayısal kod ile işaretlenerek -40°C'de saklandı. Saklanan plazma numunelerinden bir dizisinde HBV DNA kantitasyonunu belirlemek üzere gerçek zamanlı (*real time*) PCR yöntemiyle kantitatif HBV DNA analizi (Bosphore HBV Quantification Kit, Anatolia Geneworks, Türkiye) yapıldı.

Derin dondurucuda saklanmakta olan ve HBsAg reaktif bağışığı plazmalarını içeren 50 ml'lik PP tüplerden birer adet alınarak 14 kan bağışığına ait

plazmanın eşzamanlı olarak çözünmesi sağlandı. Çözünen plazmalar eşit miktarlarda karıştırılarak havuzlandı. Havuzlanmış plazmaların önce kalsiyum klorür (CaCl_2) solüsyonu ile koagülasyonu, sonra dekstran sülfat ile presipitasyonu planlandı. Bu amaçla Proksch ve ark.⁽⁴⁾ tarafından uygulanmış yöntem esas alınarak bazı modifikasyonlarla işlemler gerçekleştirildi.

Plazmanın *in vitro* koagülasyonu: Steril bir behere 1.1 gr CaCl_2 (Sigma Aldrich, Japonya) eklendi. Üzerine 200 ml havuzlanmış plazma konarak karıştırıldı, 37°C 'de 1 saat süreyle inkube edildi. Liyofilize haldeki siğir trombini (Q.F.A.Thrombine, HemosIL, Instrumentation Laboratory, ABD) steril su ile sulandırılarak çözelti haline getirildi. Sulandırılmış hâlde 100 NIH/ml siğir trombini içeriğine sahip 2 ml'lik çözelti oda ısısında CaCl_2 ile inkube edilmiş plazmaya eklenerek karıştırıldı.

Koagülasyonun makroskopik olarak görünür hale gelmesi için oda ısısında 20 dk. daha bekletilen karışım steril bir aplikatör ile koagulum hacmi küçültülerek konik tabanlı PP tüplere 50 ml olarak dağıtıldı. Yirmi dakika süreyle 4500 g'de ve 10°C 'de santrifügasyon uygulandı. Santrifügasyon sonrası üst sıvı steril bir şişede toplanarak serum havuzu oluşturuldu.

Homojenize edilmiş serum havuzundan konik tabanlı 50 ml'lik PP tüplere 45 ml eşit miktarlarda plazma dağıtılarak 3 adet tüpten oluşan bir seri hazırlandı.

Lipidlerin presipitasyonu: Serum havuzundan lipidlerin uzaklaştırılması için 3 g toz dekstran sülfat (OmniPur® Dextrane Sulfate, Calbiochem, Japonya) 100 ml steril distile su içerisinde çözündürülerek %10'luk dekstran sülfat solüsyonu hazırlandı. Elli ml'lik PP tüplere dağıtılmış 45 ml havuzlanmış seruma 5 ml %10'luk dekstran sülfat solüsyonu konarak litrede 300 mg dekstran sülfat içerecek serum tüpleri hazırlandı. Tüpler oda ısısında 30 dk. süreyle bekletilerek havuzlanmış serum içeriğinde bulunan lipidlerin presipitasyonu hedeflendi. Bekleme süresinin sonunda tüpler 20 dk. süreyle 10°C 'lik ısıda ve 4.500 g kuvvetinde santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası

dipte oluşan çökeltinin karışmasına izin vermeden ve çökelti üzerinde yaklaşık 2 ml berrak serum tabakası bırakılacak şekilde üst sıvı pipet ile çekilerek steril bir şişede toplandı. Toplanan serum konik tabanlı 15 ml'lik PP tüplere 10 ml eşit miktarlarda dağıtıldı. Tüplerde makroskopik bulanıklık varlığı nedeniyle 40 dk. süreyle 10°C 'lik ısıda ve 4500 g kuvvetinde ikinci kez santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası dipte oluşan çökeltinin karışmasına izin vermeden üst sıvı pipet ile çekilerek konik tabanlı 15 ml'lik PP tüplere aktarıldı. Bir gece 4°C 'lik soğutucuda beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonunda tüpler 40 dk. süreyle 10°C 'lik ısıda ve 4500 g kuvvetinde santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrasında dipte yoğun bir çökeltinin biriktiği ve makroskopik olarak berrak bir görünüm oluştuğu gözlemlendi. Tüplerdeki berrak üst sıvı steril bir şişede toplanarak İKK örneklerinin hazırlanacağı serum havuzu oluşturuldu (Resim 1).



Resim 1. Lipid presipitasyonu

İKK örneklerinin hazırlanması: Elde edilen serum havuzundan steril 15 ml'lik PP tüplere aktarım yapılarak fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) (RTA

Laboratuvarları, Türkiye) ile 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 ve 1/1000 sulandırılmaları hazırlandı. Her sulandırmadan birer örnek alınarak hasta ve kan bağışçılarının HBsAg taramasında kullanılan CMIA esaslı bir immünoassay cihazında (Architect i2000, Abbot laboratories, ABD) HBsAg yönünden analiz edildi. Elde edilen HBsAg S/CO değerleri çerçevesinde İKK örnekleri için uygun bir konsantrasyon sağlayabileceği öngörülen 1/100 ve 1/1000 sulandırılmış serumlar 2 ml'lik kriyotüplere dağıtılarak -40°C'de donduruldu. Orijinal serumun 1/100 ve 1/1000 oranında sulandırılmasıyla hazırlanan bu serilerdeki kriyotüpler sırasıyla "İK100" kodu verilerek "orta reaktif İKK" olarak ve "İK1000" kodu verilerek "düşük reaktif İKK" olarak etiketlendi. Sulandırım yapılmamış havuzlanmış serum ise "yüksek reaktif İKK" olarak kullanılmak üzere "İK1" koduyla etiketlenerek 2 ml'lik kriyotüplere dağıtıldı ve -40°C'de donduruldu.

Plazmaların işlenmesi ve serum örneklerinin hazırlanmasına yönelik tüm süreç Biyogüvenlik Düzey-2 (BSL-2) laboratuvar koşullarında ve bu koşullara uygun kişisel koruyucu ekipman kullanılarak yapıldı.

Kan bağışçılarının HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında korelasyon varlığı Pearson korelasyon analizi ile araştırıldı.

İKK örneklerinin performans analizi: İKK örneklerinin günler arası değişkenlik derecesinin saptanması amacıyla farklı günlerde dondurucudan çıkarılarak çözülen internal kontrol serumları hasta ve kan bağışçısı örneklerinin rutin HBsAg analizleri sırasında kontrol örneği olarak eşzamanlı test edildi. Her çalışmada, her seriden (İK1, İK100 ve İK1000) birer tüp kullanılmak üzere 21 farklı çalışmada analiz gerçekleştirildi. İKK serumları CMIA esaslı immünoassay cihazında (Architect i2000, Abbott Laboratories, ABD) kontrol numunesi olarak analize alındı.

İKK örneklerinin günler arası değişkenlik derecesinin saptanması amacıyla farklı günlerde rutin HBsAg analizi sırasında İK1, İK100 ve İK1000 kodlu örneklerden birer tüp derin dondurucudan çıkarıldı

ve oda ısısında çözülmesi beklendi. Çözülmüş örnekler bağışçı ve hastaların rutin HBsAg incelemesinde İKK örneği olarak analiz edildi. Analiz sonrasında S/CO değerleri İKK örnek performans çizelgesine kaydedildi. Hazırlanan İKK örneklerinin 21 farklı analiz sonucunda elde edilen S/CO değerleri ile Levey-Jennings grafikleri oluşturuldu.

Tanımlayıcı ve analitik istatistikler için PASW (versiyon 18.0) yazılımı (SPSS Inc. Hong Kong) kullanıldı. İKK örneklerinin S/CO ortalamaları, standart sapmaları ve değişim katsayıları belirlendi. Ölçüm değerlerinin normallik sınaması Kolmogrov-Smirnov testi ile yapıldı. Levey-Jennings grafikleri Westgard 3 sigma kurallarına göre sistematik hata ve rastgele hata yönünden incelendi.

BULGULAR

HBsAg reaktivitesi S/CO 1000 ve üzerinde saptanan ve HBsAg reaktivitesi nedeniyle bağışladıkları kan, transfüzyon için uygun bulunmayan kan bağışçılarında (n=14) toplanan plazmalarda HBV

Tablo 1. İKK örneği için seçilen bağışçı plazmalarının HBsAg ve HBV DNA içeriği

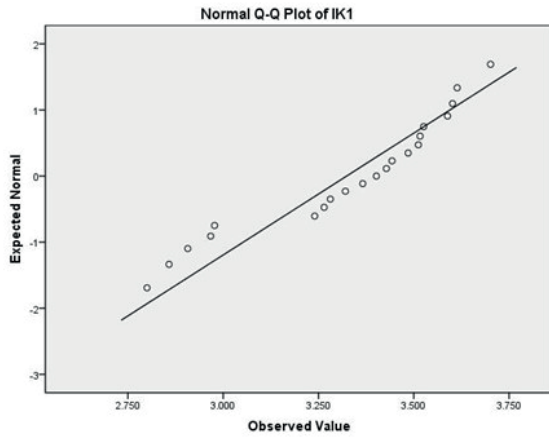
Kan Bağışçısı	HBsAg (S/CO)	HBV DNA (IU/ml)
1	4111	449
2	3950	503.7
3	3907	65.6
4	3984	12390
5	4043	3226
6	5500	396.7
7	3146	36360
8	1524	5212
9	1178	12360
10	1661	5749
11	4199	234.9
12	4212	617.1
13	3008	135300
14	5554	332.5

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni; HBV DNA: Hepatit B Virüs DNAsı; S/CO: Örnek Sinyali/Eşik Değeri, IU/ml; Enternasyonal Ünite/mililitre.

DNA konsantrasyonu 65.6 ile 135300 IU/ml arasında bulundu (Tablo 1). Kan bağışçılarının HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı. ($R=-0.2129$, $p=0.46$).

Hazırlanan her üç seriden İKK serumlarının rutin HBsAg analizi sırasında elde edilen S/CO değerleri kaydedilerek veriler tanımlayıcı ve analitik istatistiklerde kullanıldı.

Yüksek reaktif İKK (İK1) serumları ile elde edilen S/CO değerleri için ortalama 3323.75 bulunurken ortanca 3401.76 olarak, standart sapma 271.19 olarak, değişim katsayısı %8.1 olarak belirlendi. Kolmogrov-Smirnov testi ile ölçüm değerlerinin %95 güven aralığında normal dağılım gösterdiği görüldü ($p=0.2$, Şekil 1).

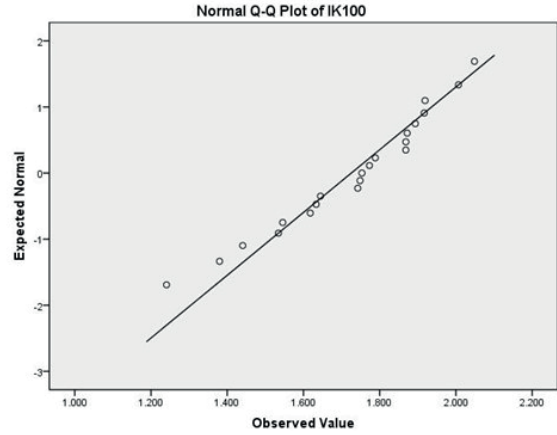


Şekil 1. Yüksek reaktif İKK ölçümlerinin dağılım (Q-Q) grafiği

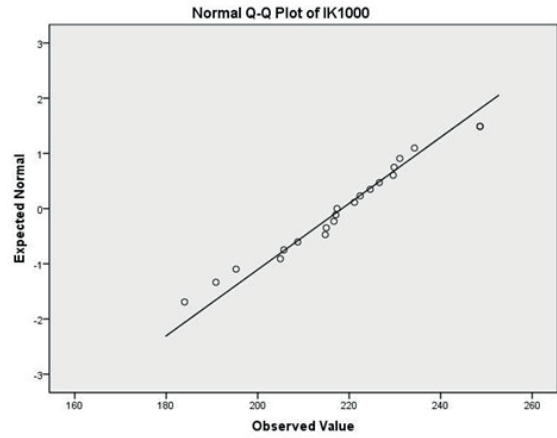
Orta Reaktif İKK (İK100) serumları için ortalama 1725.57 olarak bulunurken ortanca 1753.48 olarak, standart sapma 210.62 olarak, değişim katsayısı %12.2 olarak belirlendi. Kolmogrov-Smirnov testi ile ölçüm değerlerinin %95 güven aralığında normal dağılım gösterdiği görüldü ($p=0.2$, Şekil 2).

Düşük Reaktif İKK (İK1000) serumları için ortalama 219.57 olarak bulunurken ortanca 217.34 olarak, standart sapma 14.93 olarak, değişim katsayısı %7.6

olarak belirlendi. Kolmogrov-Smirnov testi ile ölçüm değerlerinin %95 güven aralığında normal dağılım gösterdiği görüldü ($p=0.2$, Şekil 3).



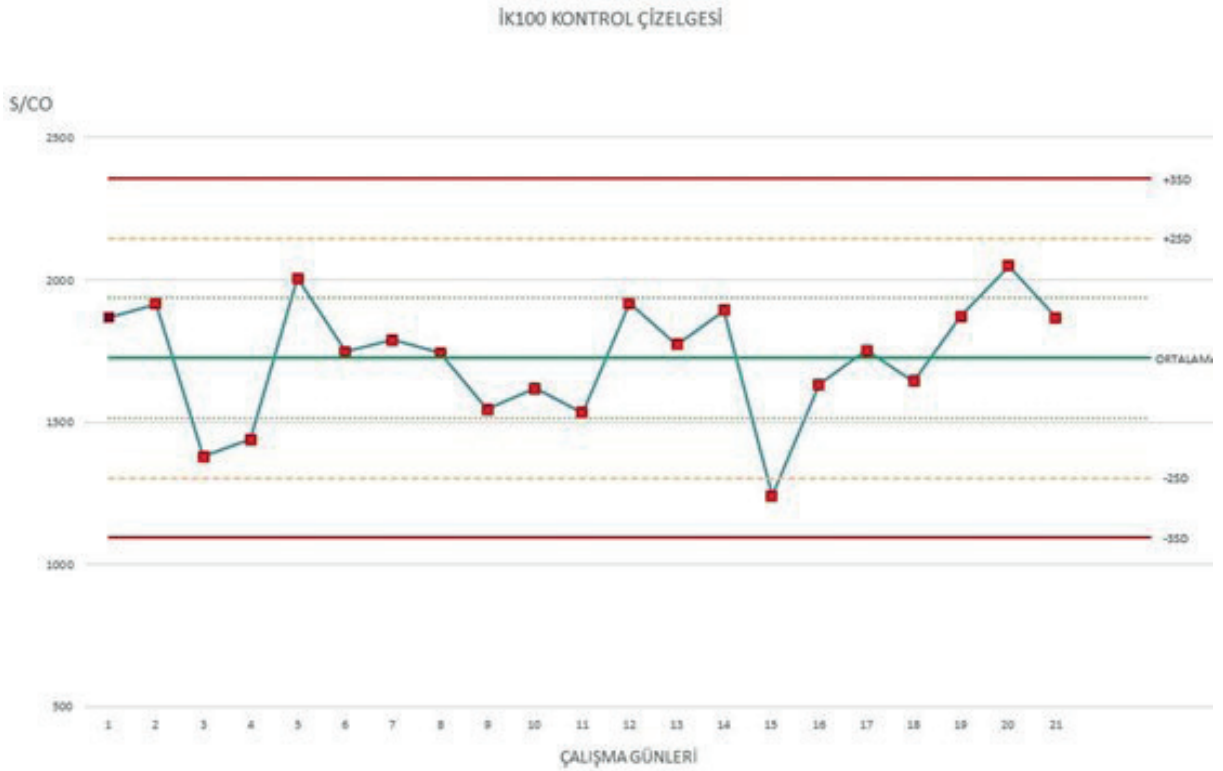
Şekil 2. Orta reaktif İKK ölçümlerinin dağılım (Q-Q) grafiği



Şekil 3. Düşük reaktif İKK ölçümlerinin dağılım (Q-Q) grafiği

S/CO değerlerinin aktarıldığı Levey-Jennings grafiklerinin incelenmesinde yüksek reaktif İKK örneklerinin tümünde ölçüm değerlerinin $\pm 2SD$ içerisinde yer aldığı görüldü.

En yüksek S/CO değeri 2048.65 olarak ölçülen orta reaktif İKK örneklerinde en düşük S/CO değeri olan 1240.71 ölçümünün $-2SD$ dışına çıktığı görüldü. Ancak, diğer tüm değerlerin $\pm 2SD$ içerisinde yer aldığı gözlemlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Orta reaktif İKK serumlarının HBsAg test performansı

En düşük S/CO değeri 190.86, en yüksek S/CO değeri 248.60 olarak ölçülen düşük reaktif İKK örneklerinde tüm değerlerin $\pm 2SD$ içerisinde yer aldığı gözlemlendi.

Orta reaktif İKK örneklerinde $-2SD$ dışına çıkan değer nedeniyle Westgard'ın 1_{2s} kuralının ihlal edildiği saptandı. Uyarıcı özellikteki bu kural ihlali dışında rastgele hata veya sistematik hataya işaret eden bir kural ihlali saptanmadı.

TARTIŞMA

HBsAg'nin 1970'lerde ABD'inde kan bağışçılarında zorunlu tarama testi olarak kabulünün ardından transfüze edilecek kan ve kan bileşenlerinde enfeksiyon göstergelerinin araştırılması yaygın bir uygulama hâlini almıştır. Ülkemizde ise 1983 yılında kabul edilen 2587 sayılı kanunun ardından yürürlüğe giren Kan ve Kan Ürünleri Yönetmeliği ile tarama testleri zorunlu kılınmıştır. Avrupa Parlamentosu ve Konseyi'nin 2002 98/EC direktifi ile kan bağışçılarında serolojik tarama testlerine ilişkin gerekliliklerin

tanımlanmasının ardından transfüzyon öncesi serolojik tarama testlerinde AB ülkeleri açısından bir ortak standart oluşturulmuştur^(5,6).

Ülkemiz mevzuatında da karşılığını bulan bu gereklilik nedeniyle kan bağışçılarında HBV, HCV, HIV ve sifilize yönelik enfeksiyon göstergelerinin taranması zorunludur⁽⁷⁾.

Zaman içerisinde nükleik asit test yöntemlerinin ve kan bileşenlerinde patojen azaltmaya yönelik teknolojilerin geliştirilmesi, serolojik tarama testlerinin geleceğini tartışmaya açsa da daha epeyce bir süre serolojik tarama testlerinden vaz geçilmesi olası gözükmemektedir. Yaygınlaşan hepatit B aşılması ve geliştirilen antiviral tedavilere karşın hepatit B enfeksiyonu yeryüzünde ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini sürdürmektedir. Kan bağışçısı kazanım programları sayesinde gönüllü ve sürekli kan bağışçılarının sayısının artması, kan bağışçılarının transfüzyon ile bulaşan enfeksiyonlara yönelik riskli davranışlar konusunda bilinçlendirilmesi

de dahil tüm gelişmelere karşı transfüzyon ile HBV bulaşma riski bulunmaktadır. HBsAg saptanmasında pek çok kısıtlayıcı durum bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi HBV enfeksiyonunun başlangıcından viral antijenin tespit edilebilir seviyeye ulaşmasına dek geçen pencere dönemidir^(8,9).

HBsAg testleri enfekte karaciğer hücrelerinden salınan viral partiküller belirli bir seviyeye ulaşmaya dek HBsAg testinde antijen saptanamamaktadır. HBsAg saptanmasında fonksiyonel viral partiküllerden daha çok sHBS moleküllerinin spontan agregasyonun bir sonucu olan sferik partiküllerin ya da tubuler partiküllerin etkili olduğu ileri sürülmüştür⁽⁸⁾.

HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA düzeylerini karşılaştıran lineer regresyon modellemelerinde bu iki ölçüm değeri arasında anlamlı pozitif bir korelasyon saptanmış olsa da HBV DNA ve HBsAg'nin hızla arttığı akut enfeksiyonun erken döneminde bu durum beklenen bir sonuçtur. Çalışmamızda, HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmaması ise öncelikle homojenize bir plazma havuzu elde etmek amacıyla seçilen kan bağışçılarının sayısının kısıtlanmasıyla ilişkilendirilebilir. Öte yandan HBsAg reaktivitesi gösteren plazmaların aktif enfeksiyonu bulunmayan taşıyıcı özelliğindeki kan bağışçılarından sağlanması da bu sonuca yol açabilir. Kan bağışçılarında HBsAg ile HBV DNA arasında korelasyon eksikliğine dikkat çeken başka çalışmalar bulunmaktadır. Kuhns ve ark.⁽¹⁰⁾ HBsAg reaktif kan bağışçılarında aşırı düşük HBV DNA düzeylerine dikkat çekmişlerdir. HBsAg reaktif kan bağışçılarının HBV DNA konsantrasyonlarını irdeledikleri çalışmalarında bağışçıların %36'sında HBV DNA konsantrasyonunu 400 kopya/ml altında bulmuşlardır. Kan bağışçılarında yapılan başka çalışmalarda da benzer sonuçlar alındığını vurgulayan aynı araştırmacılar HBsAg reaktif bağışçıların %6'sında ise HBV NAT *minipool* analizlerinde HBV DNA saptanamadığı bildirmişlerdir.

HBsAg varlığını saptamaya yönelik kalitatif test kitlerinde 0.5-100 IU/ml aralığında değişen analitik duyarlılıklar bildirilmiştir. İlk yıllarda düşük olan duyarlılıklar test tekniğindeki gelişmelere bağlı olarak artmıştır. Bu konuda, başlangıçta katı

fazda mikroplaklardan veya plastik boncuklardan yararlanılırken günümüzde kaplama yüzeyi olarak mikropartiküllerin kullanılması ve optik absorbans ölçümüne dayalı testlerden kemilüminesans temelli testlere geçilmesiyle önemli gelişme sağlanmıştır. HBsAg testlerinde önemli bir sorun ise HBV varyantlarıdır. Güvenilir bir sonuç için farklı varyantların varlığında bile test duyarlılığının etkilenmemesi gerekir^(8,11,12).

Biyolojik maddeler için standartlar oluşturmayı yönelik çalışmalar yürüten DSÖ Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi (ECBS) klinik laboratuvarlar ile kan hizmet birimlerinde ve kan ürünü veya *in vitro* diagnostik üreticileri tarafından kullanılacak HBsAg testlerinin validasyonu için de bir uluslararası standart (3rd WHO IS) hazırlamıştır. Bu standardın hazırlanma sürecindeki aşamalar ve paylaşılan deneyim çalışmamız için de yol gösterici olmuştur. HBsAg özelinde bir standart oluşturulmasında birçok etmene dikkat çekilmektedir. Özellikle kullanılan örnek matrisinin türü, standardın hazırlanma yöntemi ve antijenik varyantların önemine vurgu yapılmaktadır. DSÖ tarafından hazırlanan uluslararası standardın farklı laboratuvarlar ve farklı sistemlerle analizinde elde edilen veriler incelendiğinde örneğin niteliğinin önemi dikkat çekmektedir. HBsAg reaktif plazma kullanılması ile pürifiye ve inaktive plazma kullanılması arasında varyasyonlar yönünden önemli fark olduğu bildirilmiş, hatta bu farkın HBV genotip ya da subtip farklılıklarından daha etkili olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, potens değerlendirmelerinde kantitatif ve kalitatif yöntemler arasında anlamlı fark bulunmamıştır⁽¹³⁾. Çalışmamızda, genotiplendirme yapılmamış olması bir eksiklik olmakla birlikte, örnek sayısının azlığı nedeniyle ortaya çıkan bu durumun geniş ölçekli bir üretim sürecinde giderilmesi düşünülmelidir.

Çalışmamızda, HBsAg reaktif kan bağışçılarının plazmalarından hazırladığımız İKK serumları bağımsız kontroller olarak işlev görmek üzere üretilmiştir. Hammadde olarak serum kullanılmasının stabilite sorunlarını azaltacağı öngörülmekle birlikte, çalışmamız kan bağışçılarından (antikoagulan içeren torbalara) toplanmış kanların değerlendirilmesi düşüncesine dayandığı için İKK örneklerinin hazırlanmasında zorunlu olarak plazma kullanılmıştır.

Bu amaçla, kan bankalarında toplanmış sitratlı bağışçı kanlarının İKK numuneleri için iyi bir matris olduğu ve havuzlanmış serum kadar uygun bir hammadde olduğu görüşünü belirten Proksch ve ark.nın⁽⁴⁾ yöntemi esas alınmıştır.

HBsAg analizlerinde bağımsız kontroller olarak kullanılan İKK örneklerimize ilişkin ölçüm değerleri kontrol çizelgelerine işlenmiş ve performansları da $\pm 3SD$ içerisindeki değişim oranlarını gösteren değişim katsayısı hesaplanarak Westgard "3 Sigma" kuralı temelinde yapılmıştır. Bu değerlendirmelerde İK1, İK100 ve İK1000 serisi için tüm ölçümlerin üst (+3SD) ve alt (-3SD) kontrol sınırları içerisinde bulunduğu görülmüştür. İK100 için bir örneğin 2SD dışında bulunması nedeniyle sadece bir kez 1_{2s} kuralının ihlal edildiği görülmüştür. Westgard kurallarında uyarıcı nitelikteki bu durum diğer kontrol değerlerinin uygun olması durumunda esasen test tekrarını gerektirmeyen bir kontrol noktası olarak kabul edilmektedir. Bu uyarıcı kural dışında sistematik bir hata gözlenmemesi çalışmamız sonucunda hazırlanan İKK örnekleri ile elde edilen sonuçların tüm serilerde (İK1, İK100, İK1000) tutarlı ve uygun olduğuna işaret etmektedir.

Wilkinson ve ark.⁽¹³⁾ nativ HBsAg içeren plazmanın sulandırılmasıyla hazırlanan bir standart ile yapılan kalibrasyonda yüksek varyasyon bildirmiştir. Bu standart için saptanan değişim katsayısı oldukça yüksek olup %29 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, nativ HBsAg içeren plazmadan elde edilen serumun sulandırılmış ve sulandırılmamış formlarıyla hazırlanan kontrol örneklerinde değişim katsayıları İK1 için %8.1, İK100 için %12.2 ve İK 1000 için %7.6 olarak belirlenmiştir.

HBsAg analizinde kullandığımız immünoassay platformunda (Architecth i2000) kullanılan ticari kantitatif HBsAg kitiyle Liu ve ark.nın⁽¹⁴⁾ yaptığı bir çalışmada, düşük, orta ve yüksek HBsAg kantasyonu gösteren örneklerde elde edilen değişim katsayıları %0.44 ile %9.5 arasında bulunmuştur. Wang ve ark.⁽¹⁵⁾ da aynı platformu kullanarak, ardışık 5 günde aynı örnekleri her gün üçer kez çalışarak HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc, anti-HCV, anti-TP, and HIV-Ag/Ab test kitleriyle yaptıkları çalışmada düşük

konsantrasyondaki numuneler için %1.9 ile %7.49 aralığında, orta konsantrasyondaki örnekler için %1.29 ile %5.09 arasında, yüksek konsantrasyondaki numuneler için %1.06 ile %12.74 arasında değişen varyasyon katsayıları bildirmişlerdir.

Her üç seride de elde edilen p değerleri İKK örneklerinin ölçüm değerlerinin normal dağılımına işaret etmektedir. Hazırladığımız İKK serumları bir referans değer ile karşılaştırılmadığı için bias hesaplaması yapılmamış ve bu nedenle toplam analitik hata belirlenmesi söz konusu olmamıştır. Buna karşılık, Westgard kuralları kapsamında incelendiğinde sistematik hata saptanmamış olmasından hareketle hazırlanan İKK serumlarının rutin uygulamada kullanılabilmesi düşünülmüştür. Ancak, geniş ölçekli bir üretim sürecinde toplam analitik hatanın da belirlenebileceği referans serumlarının kullanılması daha uygun olacaktır.

Kan bankacılığında yeni tarama stratejileri konusunda Hepatit B aşılması ve antiviral tedavi olanaklarının gelişmesine karşın HBV küresel bir sorun olmayı sürdürmektedir. Ülkelerin gelişmişlik ve gelir durumlarına bağlı olarak aşıya ve tedaviye erişim olanakları değişmektedir⁽¹⁶⁾. Laboratuvar süreçleri açısından ise nükleik asit temelli testlerin yaygınlaşmasıyla kan bağışçılarında transfüzyon ile bulaşan enfeksiyon etkenlerinin araştırılmasında yeni bir kapı açılmıştır. Enfeksiyon taşıyıcılarında pencere dönemini azaltması nedeniyle büyük yarar sağlayan nükleik asit testlerinin serolojik testlerin yerini alıp almayacağı, transfüzyon öncesi tarama stratejilerinde bir değişiklik olup olmayacağı tartışılmaya başlanmıştır⁽¹⁷⁾.

Butartışma, çalışmamızın konusu olan İKK örneklerinin teminine yönelik planlamaları da belirleyeceği için önemlidir. Ülkelerin nasıl bir tarama strateji oluşturacaklarına karar vermelerinde test maliyeti önemli bir sorun olarak öne çıkmaktadır. Ancak testlerin maliyet etkinliğini belirlemede transfüzyon sonrası enfeksiyonların önlenmesine yönelik bütüncül bir yaklaşım gerekmektedir. Bu noktada HBV rezidüel bulaş riskinin bilinmesi önem taşır. Posttransfüzyonel hepatit B enfeksiyonu gelişmesi için gereken minimum enfeksiyöz doz (ID50) HBsAg

için 20-200 IU aralığında hesaplanmıştır. Bu aralığın 100-1000 viriyona denk düştüğü öngörülmektedir. Ancak, rezidüel risk yalnızca enfeksiyöz doz ile ilişkili olmayıp, HBV epidemiyolojisi, tercih edilen testlerin analitik duyarlılıkları ve uygulanan test algoritmaları ile de yakından ilgilidir. HBsAg ve nükleik asit testlerinin birlikte kullanımı rezidüel riski düşürmektedir⁽¹⁸⁾.

Pek çok ülkede yaygın olarak kullanılan patojen azaltma teknolojileri ümit verici görülmektedir. Ancak, bu yöntemlerin de tarama testlerine bir alternatif olarak değerlendirilmemesi gerekir. Özellikle viral yükü yüksek olan bağışçılardan sağlanan kanların %100 güvenli olmadığı, HBV enfeksiyon riskini önemli ölçüde azaltsa da tümüyle ortadan kaldıramadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca patojen azaltma teknolojilerinin poliovirüs ile hepatit A ve E virüsleri gibi zarfsız virüslere ve *Bacillus cereus* sporlarına etkisiz bulunduğu dair bildirimler bu yöntemin tarama testlerinin yerine geçebilme olasılığını zayıflatmaktadır^(9,19).

HBV enfeksiyon riskini azaltması öngörülen bir diğer durum hepatit B bağışıklaması olmakla birlikte, aşılanan bireylerin %5-10'unda yeterli bir antikor yanıtı gelişmediği, HBsAg ve HBeAg pozitifliği olan annelerden doğan yenidoğanların %10-30 kadarında hepatit B aşılması ile etkili bir korunma sağlanmadığı bildirilmiştir. Üstelik koruyucu düzeyde anti-HBs titresi bulunan bazı kişilerde okült HBV enfeksiyonu görülmüştür. Ayrıca Çin'de universal hepatit B aşısının uygulamaya sokulmasından sonraki dönemde doğan ve bu program çerçevesinde HBV aşılması uygun şekilde yapılmış genç kan bağışçılarında HBsAg prevalansının aşı programından önce doğmuş daha ileri yaştaki kan bağışçılara göre daha yüksek bulunması oldukça şaşırtıcıdır. Yanısıra hepatit B aşısı olmasına karşın anti-HBs geliştirmeyen ya da düşük antikor düzeylerine sahip bağışçılarda okült HBV enfeksiyonu gelişebildiği dikkate alınacak olursa aşılanmanın da kan bağışçılara yönelik tarama testlerinden vazgeçmemizi sağlayacak bir etkisi beklenmemelidir^(9,18,20,21).

Testlerde analitik duyarlılıkların artması, nükleik asit testlerinin yaygınlaşması, kan bileşenlerinde patojen

azaltma teknolojilerinin gelişmesi olumlu gelişmelerle birlikte, yakın gelecekte immünoassay temelli tarama testlerinden vaz geçilmesini sağlayacak bir durum yaratmayacaktır. Bu durumda bu testlerin kalite güvencesini sağlamaya yönelik girişimlerimizin de devam etmesi gerektiği açıktır. Kan hizmet birimlerinde kan toplama-kan bileşeni hazırlama döngüsünde işlenen önemli miktarda hücre ve plazmanın bir kısmının bağımsız kalite kontrol materyallerinin hazırlanmasında kullanılması hem kaynakların doğru kullanımı açısından hem de transfüzyon güvenliği açısından yararlı olacaktır.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (17.04.2018 tarih ve 18-4.1/47 No.lu karar) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Ege University, Clinical Research Ethics Committee (04.17.2018; 18-4.1/47).

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

KAYNAKLAR

1. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. ASM Press, Washington, DC. 2009.
2. Public Health England. Quality assurance in the diagnostic virology and serology laboratory. Standards Unit Microbiology Services. 2015.
3. Sepulveda JL. Variation, errors, and quality in the clinical laboratory. In: Dasgupta A, Sepulveda JL (Eds.) Accurate Results in the Clinical Laboratory. (2nd Ed). Elsevier 2019:3-9.
4. Proksch GJ, Bonderman DP. Preparation of optically clear lyophilized human serum for use in preparing control material. Clin Chem. 1976;22(4):456-60.
5. Fiedler SA, Oberle D, Chudy M, et al. Effectiveness of blood donor screening by HIV, HCV, HBV-NAT assays, as well as HBsAg and anti-HBc immunoassays in Germany (2008–2015). Vox Sang. 2019;114(5):443-50.
<https://doi.org/10.1111/vox.12770>

6. Dodd RY, Nguyen ML, Krysztof DE, Notari EP, Stramer SL. Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection? *Transfusion*. 2018;58(9):2166-70.
<https://doi.org/10.1111/trf.14784>
7. Örüç NE, Yenicesu İ. Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi. 2016. Avrupa Birliği'nin IPA-I finansal desteği ile Kan Tedarik Sisteminin Güçlendirilmesi Teknik Destek Projesi. <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/Yayin/523> (Erişim: Aralık 2020).
8. Allain JP, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(6):461-6.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834bac10>
9. Candotti D, Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: Need for reappraisal of blood safety measures?. *Front Med*. 2018;5:29.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029>
10. Kuhns MC, Kleinman SH, McNamara AL, et al. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. *Transfusion*. 2004;44(9):1332-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.04055.x>
11. Pronier C, Candotti D, Boizeau L, Bomo J, Laperche S, Thibault V. The contribution of more sensitive hepatitis B surface antigen assays to detecting and monitoring hepatitis B infection. *J Clin Virol*. 2020;129:104507.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104507>
12. Amini A, Varsaneux O, Kelly H, et al. Diagnostic accuracy of tests to detect hepatitis B surface antigen: a systematic review of the literature and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2017;17(Suppl 1):698.
<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2772-3>
13. Wilkinson DE, Seiz PL, Schüttler CG, et al. International collaborative study on the 3rd WHO International Standard for hepatitis B surface antigen. *J Clin Virol*. 2016;82:173-80.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.06.003>
14. Liu TW, Yeh ML, Huang CF, et al. Clinical performance of a new hepatitis B surface antigen quantitative assay with automatic dilution. *Kaohsiung J Med Sci*. 2015;31(1):26-33.
<https://doi.org/10.1016/j.kjms.2014.10.007>
15. Wang L, Chen W, Yu Y. The performance of the Abbott i2000 for measuring serum markers of infectious diseases. *J Clin Lab Anal*. 2017;31(1):e22015.
<https://doi.org/10.1002/jcla.22015>
16. Kupek E. Residual risk of hepatitis-B-infected blood donations: estimation methods and perspectives. *Int Sch Res Notices*. 2013;2013:839896.
<https://doi.org/10.5402/2013/839896>
17. Busch MP. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors?. *Transfus Clin Biol*. 2004;11(1):26-32.
<https://doi.org/10.1016/j.tracli.2003.12.003>
18. Gerlich WH, Glebe D, Schüttler CG. Hepatitis B viral safety of blood donations: new gaps identified. *Ann Blood*. 2018;3:38.
<https://doi.org/10.21037/aob.2018.09.03>
19. Godbey EA, Thibodeaux SR. Ensuring safety of the blood supply in the United States: Donor screening, testing, emerging pathogens, and pathogen inactivation. *Semin Hematol*. 2019;56(4):229-35.
<https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2019.11.004>
20. Wang Z, Zeng J, Li T, et al. Prevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in a blood donor population born prior to and after implementation of universal HBV vaccination in Shenzhen, China. *BMC Infect Dis*. 2016;16:498.
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1834-2>
21. Candotti D, Assennato SM, Laperche S, Allain JP, Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut*. 2019;68(2):313-21.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316490>

İntestinal Helmintlere Ait İkili ve Tekli PZR Protokollerinin Geliştirilmesi: Multipleks PZR Yolunda Bir Ön Çalışma

Development of Dual and Single PCR Protocols for Intestinal Helminths: A Preliminary Study on Multiplex PCR

Hayriye Kırkoyun Uysal*, Sinem Öktem Okullu**, Elif Merve Aydın***, Eray Şahin****, Bahar Akgün Karapınar*, Özgür Kurt**

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

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

*** Koç Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hücresel ve Moleküler Tıp Doktora Programı, İstanbul, Türkiye

**** Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik ve Biyoinformatik Programı, İstanbul, Türkiye

Atf/Cite as: Kırkoyun Uysal H, Öktem Okullu S, Aydın EM, Şahin E, Akgün Karapınar B, Kurt Ö. İntestinal helmintlere ait ikili ve tekli PZR protokollerinin geliştirilmesi: Multipleks PZR yolunda bir ön çalışma. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2022;52(1):73-81.

ÖZ

Amaç: Bir proje kapsamında yapılan bu ön çalışmada, dünyada ve ülkemizde ölümcül ve kronik klinik olgulara yol açtığı bilinmesine rağmen, tanı seçenekleri sınırlı olan bazı intestinal helmintlerin çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle saptanabilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Ortak çalışmalar için yurt dışındaki bir merkezden temin edilen *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.* ve *Strongyloides stercoralis* DNA'ları kullanılarak, proje süresi kapsamında, önce tekli, sonra ikili optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Bulgular: Çalışma kapsamında, *T. trichiura*'nın tekli (280 bp), *A. lumbricoides* (995 bp) - *S. stercoralis* (115 bp) ile *Taenia spp.* (950 bp) - *E. vermicularis* (400 bp)'in ikili optimizasyonları tamamlanmış, söz konusu helmintlere ait tanı protokolleri tanımlanmıştır.

Sonuç: Tamamlanan ön çalışmada araştırılan helmintlere ait iki ayrı çoklu PZR protokolü tanımlanmıştır. Sonraki dönemde, ikili PZR protokolünün genişletilerek daha çok helminti bir defada saptayabilir hâle getirilmesi yanında yeni çalışmalarla geliştirilen çoklu PZR protokollerinin hasta ve sağlıklı bireylerin dışkılarındaki tanısız duyarlılık ve özgünlüklerinin araştırılması hedeflenmektedir. Bu çabaların intestinal helmintlerin epidemiyolojisi ve klinik tablolardaki rollerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Türkiye, İntestinal helmint, çoklu polimeraz zincir reaksiyonu, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.*, *Strongyloides stercoralis*

ABSTRACT

Objective: The aim of this initial study of a project is to identify some intestinal helminths which have limited diagnostic options despite their known associations with fatal and chronic clinical cases in the world and in our country, using multiplex PCR.

Method: Using the DNAs of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.* and *Strongyloides stercoralis* which have been received from a foreign center for joint studies, single and double optimization trials of the helminths were made within the project.

Results: In the end of the study period, single optimization of *T. trichiura* (280 bp) as well as double optimizations of *A. lumbricoides* (995 bp) - *S. stercoralis* (115 bp) and *Taenia spp.* (950 bp) - *E. vermicularis* (400 bp) were completed successfully, and their diagnostic protocols were described.

Conclusion: Two different duplex, and a single PCR protocol have been completed in the initial study. The aim in the next term will be both to increase the number of helminths within the PCR protocol, and determination of the sensitivity and specificity of the tests using the stool samples of healthy persons and patients in new studies. These efforts will hopefully contribute to better understanding the epidemiology and roles of intestinal helminths in clinical cases.

Keywords: Turkey, Intestinal helminth, Multiplex PCR, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.*, *Strongyloides stercoralis*

Alındığı tarih / Received:

11.01.2022 / 11.January.2022

Kabul tarihi / Accepted:

11.02.2022 / 11.February.2022

Erken çevrimiçi / First Published:

31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

H. Kırkoyun Uysal 0000-0002-2476-3796

S. Öktem Okullu 0000-0002-2255-0930

E. M. Aydın 0000-0003-4548-5227

E. Şahin 0000-0002-0873-2439

B. Akgün Karapınar 0000-0002-3470-5346

Ö. Kurt 0000-0001-5575-588X

✉ hayriye.kirkoyun@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Bağırsak parazitleri, özellikle gelişmekte olan ülkelerin en önemli toplum sağlığı sorunları arasında yer almaktadır. Bu ülkelerde sınırlı parasal olanaklara bağlı temiz içme suyu ve etkin kanalizasyon sistemlerinin yokluğu, bireysel ve toplumsal hijyenin yetersizliği ve benzeri nedenlerle bağırsak parazitleri yalnızca kırsal bölgelerde değil şehirlerde de yaygın görülebilmektedir⁽¹⁻⁶⁾. Türkiye’de bağırsak parazitlerinin yol açtığı enfeksiyonların görülme sıklığı, farklı yöntemlerle yapılan farklı çalışmalarda %2.2-52.7 aralığında bildirilmiştir, ancak gerçek oranın özellikle sosyoekonomik olarak sınırlı bölgelerde çok daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir⁽²⁻⁵⁾. Erişkinlerde ciddi klinik bozukluklara yol açıp bazen yaşamı tehdit edebilen bağırsak parazitleri, etkin tedavi alıp iyileşemeyen çocuklar içinse kronikleşip büyüme-gelişme geriliğine yol açabilmektedir^(1,2). Bağırsak parazitleri içinde helmintler, çoğunlukla kırsal bölgelerde yaşam döngülerini kolayca tamamlayarak da şehirlerde yaşayan insanlarda da görülebilmektedir, ancak mikroskopik tespiti dayalı laboratuvar tanısında, hastanın çoğunlukla yalnızca bir güne ait dışkı örneği incelenebildiğinden, protozoonlar gibi helmintler de gözden kaçabilmektedir^(1,2,6-8). Bu durum hastaların belirlenip tedavi edilmelerinin yanı sıra helmint enfeksiyonlarının toplumsal kontrolünde yetersizliğe yol açmaktadır.

Klinik açıdan önemli helmintler arasında *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, kancalı kurt enfeksiyonları (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) ve *Taenia saginata* sayılabilir^(1,2). Bunlar arasında *E. vermicularis* ölümcül olmayan, ancak saptandığında aynı evde yaşayan herkesin tedavi olmasını gerektiren yaygın bir helminttir⁽²⁾. *E. vermicularis* enfeksiyonunun başlıca belirtisi anal kaşıntıdır; ağır olgularda ender olarak epilepsi nöbetleri yanında kız çocuklarında idrar yolu enfeksiyonları ve apandisit gibi ciddi bozukluklara yol açabilmektedir^(1,2,9). Dışkı incelemesinde *E. vermicularis* yumurtalarına rastlanabilmekle birlikte, tüm dünyada esas olarak anal bant yöntemi ile tanı konulmaktadır^(1,2,8). Bu yöntemin uygulanmasıyla ilgili özel şartlar gerekmesi (sabah uyanır uyanmaz örnek alınması veya kesin

sonuç için üç ayrı gün örnek alınması gereği), parazitin tanıda çoğunlukla atlanmasına neden olmaktadır⁽⁷⁻⁹⁾.

Ascaris lumbricoides, dünyada en sık görülen bağırsak parazitlerinden olup, her yıl yaklaşık 60 bin kişinin ölümüne yol açtığı bildirilmektedir⁽¹⁰⁾. Olgular tropikal ve subtropikal bölgelerde yoğunlaşmakta ve ağırlıklı olarak Sahra altı Afrika, Güney Amerika, Çin ve Uzak Asya’dan bildirilmektedir. Ülkemizde de ascariasis olgularına rastlanılmaktadır⁽¹¹⁾. *A. lumbricoides*’in erişkinleri bağırsaklarda, larva formları ise karaciğer ve akciğerlerde yaşamaktadır^(1,2,10). *A. lumbricoides* enfeksiyonu, parazitlerin larva formundan erişkin olana kadar yaptıkları vücut içi yolculuk nedeniyle çeşitlilik göstermekte, Löffler pnömonisinden ölümcül ileusa kadar değişebilmektedir. Tanıda dışkının mikroskopik incelenmesinin yanı sıra radyolojik incelemelerin de katkısı bulunmaktadır; son yıllarda birçok bağırsak paraziti gibi *A. lumbricoides* için de polimeraz zincir reaksiyonu (PZR; polymerase chain reaction – PCR) yöntemi bulunmaktadır^(2,11-15).

Yaygın ve klinik açıdan önemli bir diğer helmint olan *T. trichiura*, *A. lumbricoides* gibi, yumurtalarının insanlara ağız yoluyla bulaşması sonrası larvalarının çekum mukozasına yerleşmesiyle karakterizedir^(12,16). Ağır enfeksiyonlarda, hastalarda dizanteriye yol açabildikleri gibi rektum dokusunun anüsten dışarı çıktığı, “rektal prolapsus” adı verilen bozukluğa da yol açabilirler^(1,2,16,17). Tanıda mikroskopik incelemede limon şeklindeki tipik yumurtaların görülmesi olasıdır, ancak her gün dışkı örneklerinde yumurta bulunamayabileceğinden tanı konulmasında güçlükler yaşanabilmektedir^(8,17-19).

Taenia saginata, sestod grubu helmintlerden olup özgün vücut yapısıyla dikkat çekmekte, ince bağırsaklarda yerleşmektedir. Erişkinlerde gövde bölümünde yer alan gebe halkaların ayrılması sonrası dış ortama saçılan *T. saginata* yumurtaları, sığırlar tarafından alındıklarında larvaları (*Cysticercus bovis*) sığırın vücudunda farklı kaslara yerleşebilmektedir^(1,2,20). Az pişmiş etlerde canlı kalan bu larvalar ağız yoluyla alınabilmekte, insanların bağırsaklarına yerleşip olgunlaşabilmektedirler. Çoğu olguda uzun süre semptom görülmemekte, ender olarak bulantı, gastrointestinal sistem yakınmaları ve

kilo kaybı görülebilmektedir. Tanı öncelikle hastaların fark edip laboratuvara getirdikleri kopan gebe halkaların makroskobik ve mikroskobik incelemesiyle konulmaktadır. Bunun yanında dışkıda yumurtaların mikroskobik incelemeyle saptanması da olasıdır. *Taenia* spp. konusundaki araştırmalarda kullanılmakta olan PZR protokolleri de mevcuttur^(8,20,21).

Özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde tehlikeli bir parazitoz olan strongyloidosis, *S. stercoralis*'in neden olduğu bir enfeksiyondur. Otoenfeksiyon yapabilmesi, özellikle immün sistemi zayıf bireylerde ölümcül olabilen hiperenfeksiyonların oluşmasına yol açar^(1,2,22,23). Tanıda dışkı örneğinin mikroskobik incelemesinde larvaların görülmesi, çeşitli konsantrasyon yöntemleriyle larvaların saptanması ve kültür yanında serolojik yöntemler de kullanılmaktadır^(2,8,21-24).

Bağırsak helmintlerinin tanısında, etkenleri hızlı, güvenilir ve duyarlı olarak saptayabilecek laboratuvar testlerine gereksinim bulunmaktadır⁽¹³⁻¹⁵⁾. Bu kapsamda, moleküler yöntemlerin kullanımı, daha çok protozoonlara bağlı enfeksiyonlarda, tüm dünyada her geçen gün daha da önem kazanan ve yaygınlaşan bir uygulamadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı olan PZR, yüksek özgüllük ve duyarlılık özellikleri nedeniyle nicel (kantitatif) sonuç verebildiğinde tanıda altın standart olarak tanımlanabilmektedir. Çoklu PZR (Multiplex PCR) yöntemi, tek bir karışımında farklı DNA dizilerine özgü birden fazla primer çifti kullanarak aynı anda birden fazla gen bölgesini çoğaltmayı amaçlayan modifiye edilmiş bir PZR yöntemidir^(13,15). Çoklu PZR ile, örneğin hastadaki ishale neden olabilecek birçok patojen tek bir testle araştırılıp saptanabilmektedir. Bu testle ilgili en önemli zorluk, test içindeki tüm mikroorganizmaların etkin düzeyde çoğaltılabileceği uygun sıcaklık ve test sürelerinin ön çalışmalarla belirlenmesidir. Son zamanlarda çoklu PZR ile intestinal helmintlerin saptanmasına yönelik çalışmaların sayısında artış görülmektedir^(15,16,22,23-27).

Bu ön çalışmada, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Taenia* spp. ve *S. stercoralis* izolatları kullanılarak özgün bir çoklu PZR yönteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu ön çalışma için, Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda saklanmakta olan, önceki bir ortak çalışma için yurt dışından anonim olarak gönderilmiş *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Taenia* spp. ve *S. stercoralis* DNA'ları kullanılmıştır. Söz konusu DNA örneklerinin ilk aşama için ikili gruplar hâlinde optimize edilmeleri planlanmıştır. Bu amaçla yapılan ön inceleme sonrası, ikili optimizasyonlarının sıcaklık aralıkları daha yakın olduğundan "*E. vermicularis*-*Taenia* spp." ve "*Ascaris* spp.-*S. stercoralis*." ikilileri oluşturulurken *T. trichiura*'nın tek başına optimize edilmesi planlanmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Taenia spp. ve *Enterobius vermicularis* için ikili PZR optimizasyonu

Enterobius vermicularis PZR'si için daha önce kullanılmış bir primer çifti kullanılırken⁽²⁸⁾, *Taenia* spp. için bu çalışmada, GenBank üzerinden yeni bir primer çifti tasarlanmıştır. Söz konusu primer dizileri ve hedeflenen yaklaşık PZR ürün uzunlukları Tablo 1'de sunulmuştur. Bu iki hedefin aynı PZR'de belirlenebilmesi amacıyla ilgili pozitif kontrol DNA'larının kullanıldığı ve farklı sıcaklık derecelerinin denendiği "Gradient PZR" çalışması yapılmıştır. GeneMark 5X PCR Dye Master Mix II (Cat. No: RP02D-II-A) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan, iki hedefin pozitif kontrol DNA'larının kullanıldığı karışım içeriği Tablo 2'de, ısı döngü cihazı PZR programı ise Tablo 3'te belirtilmiştir.

Laboratuvarda yaptığımız denemeler sonrası PZR ürünleri %2'lik agoroz jelde, 120 V'da 40 dk. yürütülmüş; jel Etidyum Bromür çözeltisinde 30 dk. bekletildikten sonra Chemidoc Görüntüleme Cihazı (ChemiDoc™ XRS+ System, Bio-Rad Laboratories Inc., ABD) kullanılarak UV ışığı altında görüntülenmiştir. Bu işlem standart olarak diğer helmintler için de uygulanmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer	Dizi	PZR Ürünü Boyu (bç)	Tm değeri (°C)
<i>Taenia spp.</i> - F*	5'-GTCAGTATGAATAACTCGTGACGTA-3'	950	63.0
<i>Taenia spp.</i> - R**	5'-TCTGCTATGCCACTGGGAC-3'		
<i>Trichuris trichiura</i> - F	5'-GGCCCTGCTACTTTTCACCT-3'	280	55.0
<i>Trichuris trichiura</i> - R	5'-CTGGCTGGACGAAGCGTTTA-3'		
<i>Enterobius vermicularis</i> – F	5'-CACTTGCTATAACCAACAC-3'	400	63.0
<i>Enterobius vermicularis</i> – R	5'-GCGCTACTAAACCATAGACG-3'		
<i>Ascaris lumbricoides</i> – <i>Ascaris</i> -F	CTACCACATCCAAGGAAGGC	995	59.4
<i>Ascaris lumbricoides</i> – <i>Ascaris</i> -R	CTGAATACCGCTTGTCCTC		
<i>Strongyloides</i> -F	ATCGTGTCGGTGGATCATT	115	55.9
<i>Strongyloides</i> -R	CTATTAGCGCCATTGTCATTC		

*F: Forward; ileri yönlü primer

**R: Reverse; geri yönlü primer

Tablo 2. *Taenia spp.* ve *Enterobius vermicularis* çoklu gradient PZR karışım içeriği

Kimyasal (Stok Konsantrasyonu)	Miktar (1 reaksiyon için)
GeneMark PZR Karışımı (5X)	5 µL
<i>Taenia spp</i> – F (10 mM)	0.5 µL
<i>Taenia spp</i> – R (10 mM)	0.5 µL
<i>E. vermicularis</i> – F (10 mM)	0.5 µL
<i>E. vermicularis</i> – R (10 mM)	0.5 µL
<i>Taenia spp</i> – Kalıp DNA	0.5 µL
<i>E. vermicularis</i> – Kalıp DNA	0.5 µL
Nükleaz içermeyen Su	17 µL

Tablo 3. *Taenia spp* ve *Enterobius vermicularis* multipleks gradient PZR programı

Derece	Süre
94 °C	3 dk.
94 °C	30 sn.
Gradient (59 - 63 °C aralığı)	35 tekrar
72 °C	1 dk.
72 °C	10 dk.
4 °C	Sonsuz

Ascaris lumbricoides ve *Strongyloides stercoralis* için ikili PZR Protokolünün Oluşturulması:

Ascaris spp. ve *Strongyloides spp.* DNA dizilerini tek bir karışımında amplifiye edebilmek için Tablo 4'te belirtilen çoklu PZR karışımı hazırlanmış ve pozitif kalıp DNA olarak *Ascaris spp.* ve *Strongyloides spp.* genomik DNA izolatları kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise DNA içermeyen PZR karışımı kullanılmıştır. Optimum yapışma (annealing) sıcaklık değeri için gradient PZR yapılmış ve en uygun sıcaklık 62°C olarak belirlenmiştir. Çoklu PZR çalışması için T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, ABD) cihazı kullanılmış ve Tablo 5'te belirtilen PZR koşulları takip edilmiştir.

Trichuris trichiura için PZR optimizasyonu

Trichuris trichiura'nın PZR ile belirlenmesi için de GenBank üzerinden yeni bir primer çifti tasarlanmıştır (Tablo 1). Tasarlanan primerlerin ideal çalışma sıcaklıkları ve özgün hedef bölgenin çoğaltılmasına yönelik optimizasyonu için gradient PZR yapılmış, bu amaçla hazırlanan karışımının içerik bilgisi Tablo 6'da, PZR programının detayları ise Tablo 7'de sunulmuştur.

Tablo 4. *Ascaris lumbricoides* ve *Strongyloides stercoralis*'in ikili PZR karışım içeriği

PZR Karışımı	Miktar
PFU Master Mix (5X)	5 µL
Forward Primer (10mM)	0.3 µL + 0.3 µL
Reverse Primer (10mM)	0.3 µL + 0.3 µL
dH ₂ O	17.8 µL
DNA	0.5 µL + 0.5 µL

Tablo 5. *Ascaris lumbricoides* ve *Strongyloides stercoralis*'in ikili PZR optimizasyon sonuçları

Sıcaklık	Zaman
94°C	3 dk.
94°C	30 sn.
62°C	30 sn. (30X)
72°C	1 dk.
72°C	10 dk.
4°C	Sonsuz

Tablo 6. *Trichuris trichiura* için hazırlanan gradient PZR karışım içeriği

Kimyasal (Stok Konsantrasyonu)	Miktar (1 reaksiyon için)
GeneMark PZR Karışımı (5X)	5 µL
<i>T. trichiura</i> - F (10 mM)	0.5 µL
<i>T. trichiura</i> - R (10 mM)	0.5 µL
<i>T. trichiura</i> - Kalıp DNA	0.5 µL
Nükleazsız Su	18.5 µL

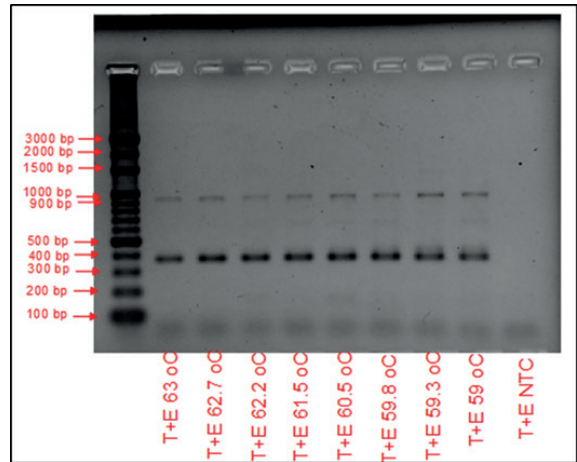
Tablo 7. *Trichuris trichiura* için sürdürülen gradient PZR programı

Sıcaklık	Süre
94 °C	3 dk.
94 °C	30 sn.
Gradient (55 °C ve 60 °C aralığı)	35 tekrar
72 °C	1 dk.
72 °C	10 dk.
4 °C	Sonsuz

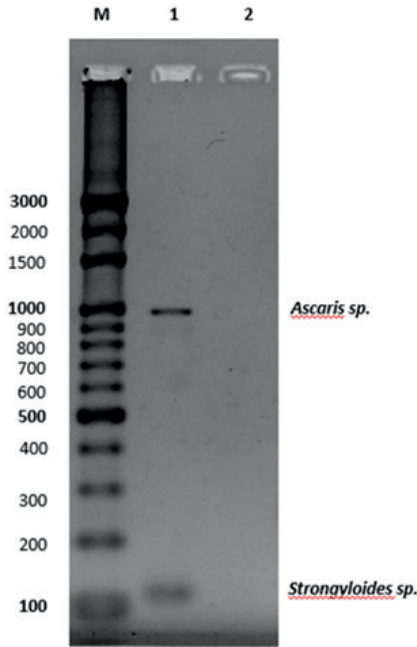
BULGULAR

Bu ön çalışma kapsamında, söz konusu helmintlerin (*A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *T. trichiura*, *Taenia* spp. ve *E. vermicularis*) özgün tekli ve ikili (*Taenia* spp. - *E. vermicularis* ve *A.lumbricoides* – *S.stercoralis*) PZR protokolleri geliştirilmiştir.

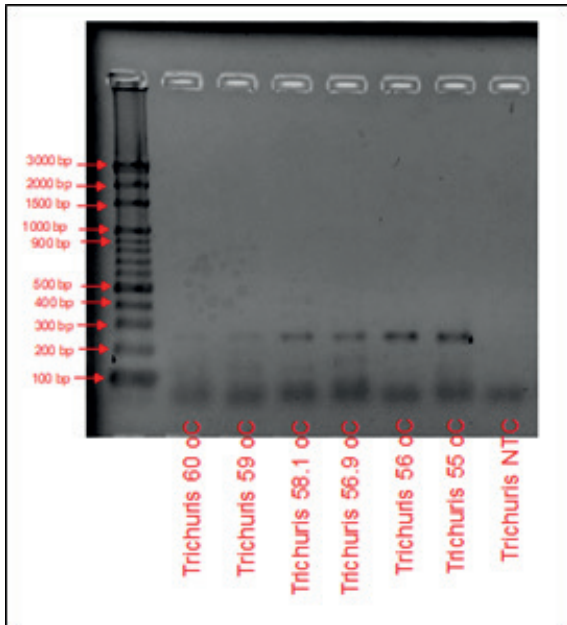
Primerler ile çoğaltılması amaçlanan hedef DNA dizilerine ait uzunluk *Taenia* spp. için yaklaşık 950 bç, *E. vermicularis* için ise yaklaşık 400 bç'dir. Bu doğrultuda denenen sekiz sıcaklıkta da hem *Taenia* spp. hem de *E. vermicularis* için hedef diziler tek reaksiyonda başarıyla çoğaltılabildiği görülmüştür. Bazı sıcaklıklarda görülen spesifik olmayan bantların 62.7°C ve 63°C'lik tutunma sıcaklıklarında ortadan kaybolduğu izlenmiştir (Resim 1).

Resim 1. *Taenia* spp. ve *Enterobius vermicularis* gradient PZR'sine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (T: *Taenia* spp., E: *E. vermicularis*)

Bu bulgular doğrultusunda, *Taenia* spp. ve *E. vermicularis* parazitleri için tasarlanan primerlerin hedef dizileri pozitif kontrol DNA'ları kullanıldığında başarıyla çoğaltabildikleri ve hatta beraber tek reaksiyonda 63°C'lik tutunma sıcaklığında kullanılabilecekleri gösterilmiştir.



Resim 2. *Ascaris lumbricoides* ve *Strongyloides stercoralis*'e ait PZR çalışması, jel elektroforez görüntüsü; Sütun M, 100 bp-3000 bp marker (GeneMark); Sütun 1, *Ascaris* spp. (995 bp) ve *Strongyloides* sp. (115 bp) primerlerinin multiplex PZR reaksiyonu; Sütun 2, negatif kontrol.



Resim 3. *Trichuris trichiura* gradient PZR'sine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çalışmanın bir diğer aşamasında, *Ascaris* spp. ve *Strongyloides* spp. primerlerinin ikili PZR ürünleri jel elektroforez sonucuna göre beklenen bant boyutlarında pozitif sonuç vermiş, protokol başarıyla optimize edilmiştir (Resim 2).

Trichuris trichiura için tasarlanan primer çifti ile çoğaltılması amaçlanan hedef DNA dizilerine ait uzunluk için yaklaşık 280 bç'dir. Gerçekleştirilen gradient PZR sonucunda yukarıdaki şekilde de görüleceği üzere; 55°C ve 56°C tutunma sıcaklıkları primerlerin spesifik olarak hedeflenen diziyi çoğaltabildiği değerlerdir ve spesifik olmayan bant gözlenmemiştir (Resim 3).

TARTIŞMA

İntestinal parazitler olarak genelde akla ilk önce *Entamoeba* spp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. gibi protozoonlar gelse de, helmintlerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri de yüzyıllardır bilinmektedir^(1,2,10). Helmint enfeksiyonları sosyoekonomik düzeyi düşük bölgelerde, içme suyu kaynakları ve genel fiziksel altyapının yetersizliğine bağlı hijyen eksikliğiyle doğrudan ilişkili olarak sık görülmektedir⁽²⁹⁾. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, insanlarda çok sayıda helmint enfeksiyonuna rastlandığı, özellikle çocuklarda rastlanılan helmint enfeksiyonlarının çocuklarda büyüme gelişme geriliği ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir^(1,6,30).

Tüm dünyada, intestinal parazitlerin tanısında sıklıkla dışkı mikroskopik incelemesi tercih edilmektedir. İntestinal parazitlerin her gün dışkı ile atılmadıkları, dolayısıyla bu incelemelerin bazen "yanlış-negatif" sonuçlanacağı bilinse de, çoğu zaman hastaya ait tek bir dışkı örneği ile tanı konulmaya çalışılmakta, bu nedenle de birçok hastaya tanı konulmadığı tahmin edilmektedir^(1,2,8).

Mikrobiyolojik tanıda devrim yaratmış olan PZR, bağırsak parazitlerinden protozoonların rutin tanısında her geçen gün daha sık kullanılmaktadır. PZR'nin geleneksel tanı yöntemlerine kıyasla çok daha duyarlı ve özgül olduğu, tek bir dışkı incelemesiyle dahi hastadaki parazitin saptanabildiği

gösterildiği gibi⁽¹³⁻¹⁵⁾, çalışan personelin maliyetleri ile kıyaslandığında çok sayıda örneğe PZR ile tanı konulmasının rutin tanı maliyetlerini düşürdüğü de bildirilmektedir⁽²⁵⁻²⁷⁾. Bu nedenle, PZR'nin intestinal parazitler için altın standart olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir⁽³¹⁾. Literatür incelendiğinde, helmintlerle ilgili çoklu PZR çalışmalarında intestinal helmintlere ait çalışmaların daha az yer tuttuğu ancak son yıllarda artış eğiliminde olduğu dikkati çekmektedir⁽²³⁻²⁷⁾. Bunun nedenleri arasında, PZR'nin maliyetinin her geçen gün azalmasıyla diğer tanı seçeneklerinin maliyetine yaklaşması sayılabilir⁽³²⁾. Nitekim, Sri Lanka'da yapılan bir çoklu PZR çalışmasında, *A. lumbricoides*, *E. vermicularis* ve *S. stercoralis*'in bu yöntemle hasta örneklerinde başarıyla denendiği ve maliyetinin mikroskopik incelemeye göre makul düzeyde bulunduğu bildirilmiştir⁽²³⁾. Ayrıca, tanısal etkinlik olarak konsantrasyon yöntemi gibi yaygın kullanılan etkin yöntemlere göre daha etkili protokoller geliştirilmeye başlanmıştır. Son zamanlarda *A. lumbricoides*, *N. americanus* ve *S. stercoralis*'e yönelik geliştirilen çoklu PZR protokolünün, formol eter asetat konsantrasyonuna göre toplamda beş kat, *S. stercoralis* saptamak açısından iki kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir⁽³²⁾. Ülkemizde de yer yer klinik olgular^(33,34) bildirilen *S. stercoralis* enfeksiyonu ile ilgili özgün bir PZR protokolü geliştirilmesi, özellikle immünsüpresif hastalara yönelik taramalarda kullanılıp hasta için etkin bir tanı ve tedavi hizmeti verilmesine olanak sağlayabilir.

Proje kapsamında yapılan bu ön çalışmamızda, klinik açıdan önemli enfeksiyonlara yol açtığı bilinen ancak tanısal seçenekleri sınırlı intestinal helmintlerin moleküler tanısı kapsamında ikili ve tekli PZR ile tanısına yönelik optimizasyon deneyleri tamamlanmıştır. Deneyler kapsamında *Taenia* spp. - *E. vermicularis* ile birlikte *A. lumbricoides* - *S. stercoralis* için kullanılabilir ikili PZR protokolleri geliştirilmiştir. Bu iki protokolden özellikle *A. lumbricoides* ve *S. stercoralis*'in birlikte saptanabildiği protokol, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda *S. stercoralis*'in neden olduğu klinik durumlar düşünüldüğünde yaşam kurtarıcı olabilir^(22,33,34). *A. lumbricoides* enfeksiyonunda vücuttaki parazitlerin erkek cinse ait olması durumunda mikroskopik tanıda yumurta görülemeyip tanı konulamaması olasıdır;

bunun yanında parazitin ileus gibi yaşamı tehdit eden klinik tablolara yol açabildiği düşünüldüğünde çoklu PZR ile *A. lumbricoides* aranması yaşam kurtarıcı dahi olabilecektir^(2,10,26).

Geliştirdiğimiz diğer protokol ile, yine tanısında zorluklar yaşanan iki helmintin, *E. vermicularis* ile *Taenia* sp., bir arada etkin saptanması mümkün olabilecektir. Halk arasında kıl kurdu olarak bilinen *E. vermicularis*, özellikle çocuklarda çok yaygın görülmekle birlikte, rutin dışkı incelemesinde ender olarak tanı konulabilmekte, parazit çoğunlukla anal bant yöntemiyle saptanabilmektedir^(2,9). Bu yöntemin doğru bir şekilde gerçekleştirilmesi (tuvalet öncesi, banyo veya duş ile temizlenmeden, üç ayrı sabah anal bant örneğinin alınması) olası olmadığında *E. vermicularis* tanısı çoğu kez atlanmakta, ev ve okul içi salgınlara yol açabilmektedir. Çocuklarda *E. vermicularis*'in çoğunlukla anal kaşıntı, uykusuzluk, huzursuzluk gibi yakınmalar yanında ender olarak idrar yolu enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilmesi, ev içi diğer bireylere kolaylıkla bulaşabilmesi nedeniyle tanısı önem taşımaktadır^(1,2,9). Keza, *Taenia* spp. enfeksiyonlarının kişide zaman zaman gastrointestinal yakınmalara yol açmasına rağmen genelde sessiz karakteri, ülkemizde nadir görülse de *T. solium* larva enfeksiyonlarının ölümcül beyin tutulumuna neden olabilmesi nedeniyle tenyalar için de etkin bir tanı seçeneği gerekmektedir^(1,2,20). Burada geliştirdiğimiz ikili PZR protokolünde herhangi bir tenya türü ile enfekte bireyler saptanabilecek, sessiz enfeksiyonlar belirlenebilecektir.

Sonraki dönemde bu yöndeki çalışmalarımıza devam etmeyi, öncelikle *A. lumbricoides* - *S. stercoralis* ikili protokolüne *T. trichiura*'yı ve sonrasında kancalı kurtları ekleyerek çoklu PZR protokolünün geliştirilmesini ve tanısal etkinliğinin artırılmasını hedeflemekteyiz. Sonrasında optimizasyonu tamamlanmış protokollerin hasta ve sağlıklı insanlara ait dışkı örneklerindeki tanısal etkinliklerinin yeni bilimsel çalışmalarla araştırılmaları, tanısal duyarlılık ve özgüllük düzeylerinin belirlenmesi öncelikli hedef olacaktır. Günümüzde yalnızca intestinal helmintleri değil, insanlarda ishale yol açan tüm mikrobiyal etkenleri bir arada saptamayı hedefleyen ticari kitler geliştirilmiş durumdadır⁽³⁵⁾. Benzer

çalışmaların artması ve çoklu PZR uygulamalarının yaygınlaşmasıyla intestinal helmintlerin toplumdaki epidemiyolojik yaygınlıkları ve klinik rolleri daha iyi anlaşılacak, hastalara tedavi başlanma süresi kısaltarak paraziter hastalıklarla mücadele daha etkin yürütülebilecektir.

Etik Kurulu Onayı: Bu çalışma için Etik Kurul onayı gerekli olmadığından alınmamıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Teşekkür: Çalışmada kullanılan helmintlere ait DNA örneklerini (kimlikleri saklı hâlde) bizimle paylaşan Danimarka Kopenhag'daki Statens Serum Enstitüsü'nden Dr. Rune Stensvold'a teşekkür ederiz.

Finansal Destek: Bu araştırma İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 50980 No.lu proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: No ethical approval was received for this study as not required.

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

Acknowledgement: We thank to Dr. Rune Stensvold from Statens Serum Institute in Copenhagen-Denmark for sharing the DNA samples of the helminths in the study (anonymously).

Funding: Istanbul University Commission of Scientific Research Projects (Project No: 50980).

KAYNAKLAR

- Garcia LS, Bruckner DA. Clinically Important Human Parasites. In: Diagnostic Medical Parasitology (3rd ed.). Washington DC: American Society for Microbiology, 1993;3-307.
- Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Bölüm VII: Sindirim sisteminde görülen helmint hastalıkları. In: Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:22. İzmir: Meta Basım, 2007;669-773.
- 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>
- 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>
- Ergüden Gürbüz C, 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>
- Özyurt M, Kurt Ö, Yaman O, Ardıç N, Haznedaroğlu T. Bir eğitim hastanesi koproloji laboratuvarında geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg. 2007;31(4):306-8.
- Limoncu ME, Ok ÜZ. Taze dışkı örneğinin toplanması, tespit edilmesi ve nakli. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (ed.). Parazitolojide laboratuvar. İzmir: Meta basım, 2011;9-16.
- Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Makroskobik inceleme ve taze dışkı incelemeleri. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (ed.). Parazitolojide laboratuvar. İzmir: Meta basım, 2011;17-22.
- Patmano M, Gümüşt T, İlhan Türkel F. A rare cause of acute appendicitis: *Enterobius vermicularis*. Türkiye Parazit Derg. 2021;45(3):220-2. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.6731>
- de Lima Corvino DF, Horrall S. Ascariasis. [Updated 2021 Oct 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. (Erişim Tarihi: Ocak 2022)
- Ozdemir O. Loeffler's syndrome: A type of eosinophilic pneumonia mimicking community-acquired pneumonia and asthma that arises from *Ascaris lumbricoides* in a child. North Clin Istanbul. 2020;7(5):506-7. <https://doi.org/10.14744/nci.2020.40121>
- Ojha SC, Jaide C, Jinawath N, Rotjanapan P, Baral P. Geohelminths: public health significance. J Infect Dev Ctries. 2014;8(1):5-16. <https://doi.org/10.3855/jidc.3183>
- Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö. Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. Erciyes Üni Vet Fak Derg. 2011;8(1):43-51.
- Gough R, Ellis J, Stark D. Comparison and recommendations for use of *Dientamoeba fragilis* real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2019;57(5):e01466-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01466-18>

15. 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.cl.2015.02.006>
16. Khurana S, Singh S, Mewara A. Diagnostic techniques for soil-transmitted helminths- recent advances. *Res Rep Trop Med*. 2021;12:181-96.
<https://doi.org/10.2147/RRTM.S278140>
17. Viswanath A, Williams M. "Trichuris Trichiura (Whipworm, Roundworm)". StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018. (Erişim Tarihi: Ocak 2022)
18. Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho OS, Correa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol*. 2002;24(11-12):499-509.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2002.00600.x>
19. Tokmak N, Koc Z, Uluşan S, Koltas IS, Bal N. Computed tomographic findings of trichuriasis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(26):4270-2.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i26.4270>
20. Pawlowski ZS, Murrell KD. Taeniasis and Cysticercosis. In: *Foodborne Disease Handbook* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press, 2018.
21. Aung AK, Spelman DW. *Taenia solium*, taeniasis and systicercosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(5):947-54.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0684>
22. Vasquez-Rios G, Pineda-Reyes R, Pineda-Reyes J, Marin R, Ruiz EF, Terashima A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a deeper understanding of a neglected disease. *J Parasit Dis*. 2019;43(2):167-75.
<https://doi.org/10.1007/s12639-019-01090-x>
23. Gunathilaka N, Chandrasena N, Wijerathna T, et al. Descriptive investigation of strongyloidiasis Infection and characterization of *Strongyloides stercoralis* using morphological and molecular-based methods. *Case Rep Infect Dis*. 2020;2020:5431491.
<https://doi.org/10.1155/2020/5431491>
24. Hii SF, Senevirathna D, Llewellyn S, et al. Development and evaluation of a multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction for hookworm species in human stool. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99(5):1186-93.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0276>
25. Zhu GQ, Li L, Ohiolei JA, et al. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Taenia hydatigena*, *T. multiceps*, *T. pisiformis*, and *Dipylidium caninum* infections. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):854.
<https://doi.org/10.1186/s12879-019-4512-3>
26. Sanprasert V, Kerdkaew R, Srirungruang S, Charuchaibovorn S, Phadungsaksawasdi K, Nuchprayoon S. Development of conventional multiplex PCR: A rapid technique for simultaneous detection of soil-transmitted helminths. *Pathogens*. 2019;8(3):152.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8030152>
27. 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>
28. Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south American human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(Suppl1):67-9.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000900013>
29. 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>
30. Balcioglu IC, Kurt O, Limoncu ME, et al. Rural life, lower socioeconomic status and parasitic infections. *Parasitol Int*. 2007;56(2):129-33.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.01.005>
31. 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>
32. Mbong Ngwese M, Prince Manouana G, Nguema Moure PA, Ramharter M, Esen M, Adégnika AA. Diagnostic techniques of soil-transmitted helminths: Impact on control measures. *Trop Med Infect Dis*. 2020;5(2):93.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020093>
33. Oktar N, Ozer HM, Demirtas E. Central nervous system *Strongyloides stercoralis*. A case report. *Turk Neurosurg*. 2020;30(5):776-9.
<https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.22886-18.2>
34. Nazik S, Yıldız F. A case of rheumatoid arthritis with *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. *Turkiye Parazitoloj Derg*. 2020;44(2):112-4.
<https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6222>
35. 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>

Trakeal Aspirat Örneğinden İzole Edilen Ender Bir Etken: *Brevundimonas vesicularis*[§]

A Rare Causative Agent Isolated from Tracheal Aspirate Sample: *Brevundimonas vesicularis*

Nadire Seval Gündem*[©], Feyza Çetin*[©], Kadir Yümlü**[©]

* Dr. Ali Kemal Belviranlı Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya, Türkiye

** Dr. Ali Kemal Belviranlı Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Neonatoloji, Konya, Türkiye

Atf/Cite as: Gündem NS, Çetin F, Yümlü K. Trakeal aspirat örneğinden izole edilen ender bir etken: *brevundimonas vesicularis*. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):82-88.

Öz

Brevundimonas vesicularis, non-fermentatif, oksidaz ve katalaz pozitif, Gram-negatif aerobik basildir. Özellikle immunsupresif hastalarda olmak üzere hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojen bakteridir. Literatürde enfeksiyon etkeni olduğu olgu sayısı oldukça azdır. Bakteriyemi, neonatal sepsis, endokardit, menenjit, ve peritonit olgularından izole edildiğine dair çalışmalar vardır. Yapılan çalışmalarda, *Brevundimonas vesicularis*'in in-vitro antibiyotik duyarlılığının değişkenlik göstermekle birlikte, genellikle antipsödomonal penisilinlere, aminoglikozidlere ve karbapenem türü antibiyotiklere duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu olgu sunumunda, yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan ve solunum yetmezliği nedeniyle mekanik ventilatöre bağlı olan bir yenidoğanın trakeal aspirat örneğinden izole edilen ender görülen bir mikroorganizma olan *Brevundimonas vesicularis* ve antibiyotik duyarlılığı sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Brevundimonas vesicularis*, trakeal aspirat, yenidoğan

ABSTRACT

Brevundimonas vesicularis is a non-fermentative, oxidase and catalase positive, gram negative aerobic bacillus. It is an opportunistic pathogenic bacteria that causes nosocomial infections, especially in immunosuppressive patients. The number of cases associated with this agent is limited in the literature and its isolation from cases of bacteremia, neonatal sepsis, endocarditis, meningitis and peritonitis has been reported. Despite the fact that the studies indicated varying levels of in vitro antibiotic susceptibility of *Brevundimonas vesicularis*, it is generally susceptible to antipseudomonal penicillins, aminoglycosides and carbapenem type antibiotics. In this case report, *Brevundimonas vesicularis*, a rare microorganism isolated from tracheal aspirate sample of a newborn hospitalized in the neonatal intensive care unit and dependent on mechanical ventilator due to respiratory failure, and its antibiotic susceptibility status were presented.

Keywords: *Brevundimonas vesicularis*, neonate, tracheal aspirate

Alındığı tarih / Received:

13.05.2021 / 13.May.2021

Kabul tarihi / Accepted:

04.09.2021 / 04.September.2021

Erken çevrimiçi / First Published:

31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

N. S. Gündem 0000-0003-3157-6849

F. Çetin 0000-0001-5714-3617

K. Yümlü 0000-0002-1634-5084

✉ sevalgndem@yahoo.com

[§] Bu çalışma, 25-27 Aralık 2020 tarihinde yapılan "TMC 2020 Çevrim İçi Mikrobiyoloji Sempozyumu"nda poster bildirisi olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Brevundimonas türleri son yıllarda özellikle immunsupresif hastalarda olmak üzere hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojenlerdir. Yapılan çalışmalarda, önce *Corynebacterium*, ardından *Pseudomonaceae* ailesi içerisine dâhil edilmiş, 1994 yılında Segers ve ark. tarafından 16S rRNA sekans analizine göre yeniden sınıflandırılmış, *Alphaproteobacteria* sınıfının *Caulobacteraceae* ailesine ait olduğu bildirilmiştir⁽¹⁻⁵⁾. Bugüne

kadar *Brevundimonas* cinsine ait yaklaşık 25 tür tanımlanmıştır^(1,4). İnsanda en sık enfeksiyona yol açan tür *Brevundimonas vesicularis*'dir. *Brevundimonas diminuta* ise daha az sıklıkla enfeksiyon etkeni olan fırsatçı patojendir⁽⁶⁾.

Brevundimonas vesicularis, non-fermentatif, gram negatif, oksidaz ve katalaz pozitif, aerobik basildir. Endojen insan florasının yanı sıra sulardan ve topraktan da izole edilmiştir. Koyun kanlı agar (KKA) ve çikolata agar (ÇA) besiyerlerinde sarımsı renkte,

opak, dairesel, dışbükey koloniler oluşturmakta ve geç üremektedir^(1,3,4,7). Yapılan çalışmalarda, MacConkey agarda uzun süren inkübasyon sonucunda gözle görülebilen koloniler oluşturduğu bildirilmiştir. Literatürde *B. vesicularis*'in enfeksiyon etkeni olduğu olgu sayısı sınırlıdır⁽⁷⁾.

Bu olgu sunumunda, yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan ve solunum yetmezliği nedeniyle mekanik ventilatöre bağlı olan bir yenidoğanın trakeal aspirat örneğinden izole edilen ender görülen bir mikroorganizma olan *B. vesicularis* ve antibiyotik duyarlılığı sunulmuştur.

OLGU

Doğum ağırlığı 1.900 gram olan, 36 gebelik haftasında normal vajinal yoldan doğan kız bebek, mekonyum aspirasyon sendromu nedeniyle entübe edilerek yenidoğan yoğun bakım ünitesine yatırılmıştır. Doğumda bebeğin Apgar skoru 1. dk.'da 2, 5. dk.'da 5'tir. Fizik muayenesinde kalp tepe atımı 160/dk., kan basıncı 54/23 mmHg, ateş 37.1°C, oksijen saturasyonu <%92 olarak ölçülmüştür. Solunumu takipneik olup, interkostal çekilmeleri ve dinlemekle bilateral kaba ralleri vardır. Sendromik yüz görünümü olan hastanın, ön fontaneli 2x2 cm. genişliğinde, kulakları düşük, burun kökü basık ve alını geniştir. Hastada konjenital glokoma bağlı lökom olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, göğüs kafesi geniş, başı vücuduna göre büyük görünümde, ekstremiteleri ve boyu kısadır. Hastada akondroplazinin eşlik ettiği sendromlar düşünülmüştür. Kalpte 1/6 derece sistolik üfürüm saptanmıştır. Hastanın soy geçmişinde haladayı çocukları olan 20 yaşında baba ve 19 yaşında annenin ilk yaşayan bebekleri olduğu öğrenilmiştir. Annenin ilk gebeliği düşükle sonuçlanmıştır.

Prematürite, mekonyum aspirasyon sendromu ve akondroplaziye sekonder solunum yetmezliği nedeniyle entübe edilen hastaya mekanik ventilasyon desteği sağlanmıştır. Hastanın yatışında alınan kan örneklerinde hemoglobini 21.2 g/dl'dir (normal: 17-20 g/dl). Lökositozu (lökosit: 30.1 10⁹/L; normal 4-20 10⁹/L) ve trombositopenisi (trombosit: 92 10⁹/L; normal 100-420 10⁹/L) mevcuttur. C reaktif protein seviyesi yükselmiştir. (CRP: 35.2 mg/L;

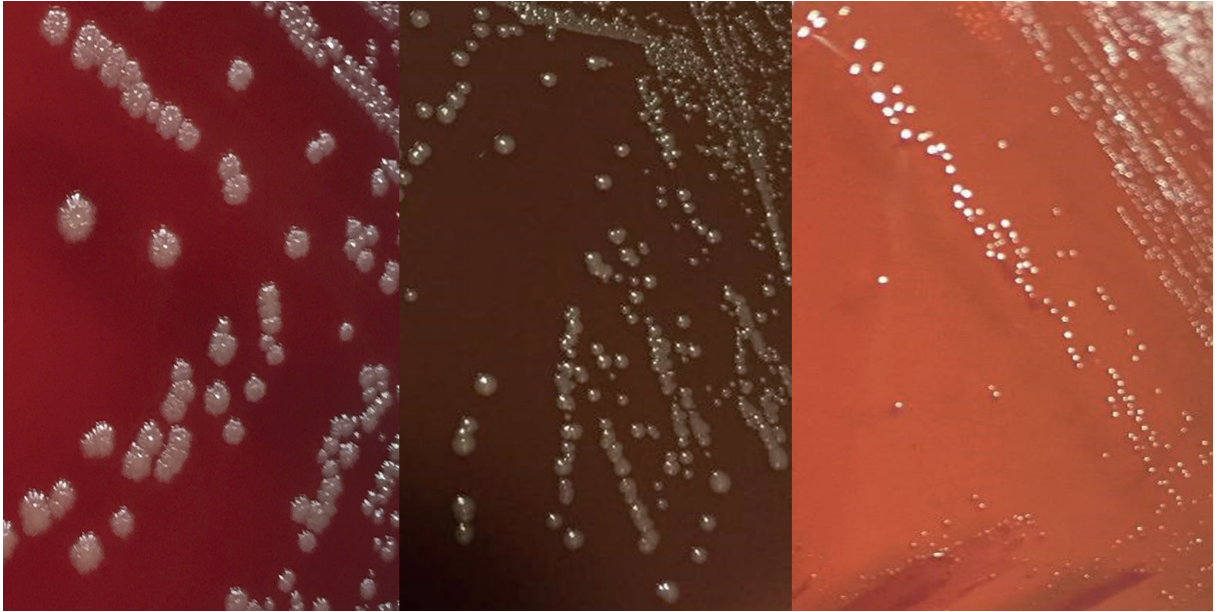
normal 0-5 mg/L). ALT, AST ve diğer biyokimyasal testleri normal sınırlardadır. Kranial ultrason ve tüm batın ultrasonunda patolojik bulgu yoktur. Ekokardiyografide 2 mm. patent duktus arteriosus, bikusbit aorta, eser derecede aort ve mitral yetmezliği saptanmıştır. Patent duktus arteriosus için yaşamın ilk haftasında medikal kapatma protokolü uygulanmıştır. Yaşamın yedinci gününde kan gazının solunumsal asidoz (venöz pH: 6.93, pCO₂: 73 mmHg, laktat 14.4 mmol/L, baz açığı:-18 mmol/L) bulgularıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Akciğer grafisinde respiratuvar distres sendromu ve mekonyum aspirasyonuna ait yaygın atelektazi ve hava bronkogramları izlenmiştir. Uzun süre mekanik ventilatör desteği sağlanan hastanın sonraki akciğer grafilerinde bilateral bronkopnömonik infiltrasyonların (Resim 1) görülmesi üzerine yoğun pürülan trakeal sekresyonundan aspirat kültürü alınmıştır. Eşzamanlı olarak kan ve idrar kültürleri de alınarak laboratuvara gönderilmiştir. İdrar kültüründe üreme olmamıştır. Her iki kan kültüründe *Staphylococcus haemolyticus* üremesi ve klinik tablonun sepsisle uyumlu olması nedeniyle ampirik başlanan ampicilin-gentamisin tedavisi kesilerek teikoplanin ve amikasine geçilmiştir.



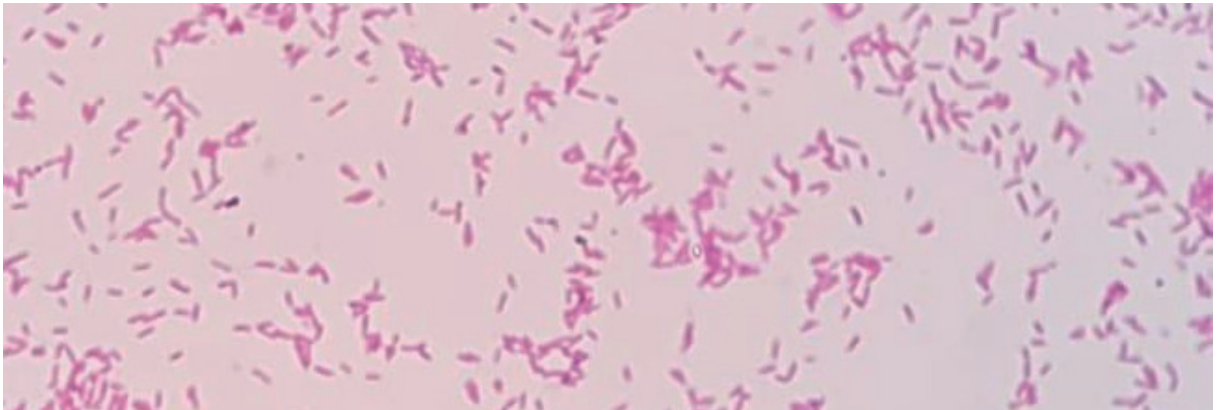
Resim 1. Akciğer grafisinde bilateral bronkopnömonik infiltrasyonla uyumlu görünüm

Hastanın laboratuvarımıza gönderilen trakeal aspirat örneğinin Gram boyamasında her alanda 5–10 adet polimorf nüveli lökosit ve Gram-negatif basiller saptanmıştır. Örnek KKA (RTA, Türkiye), ÇA (RTA, Türkiye) ve eosin methylen blue agar (EMB) (RTA, Türkiye) besiyerlerine kantitatif ekim yapılarak 37°C’de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 10⁵ kob/ml üreme saptanan, oksidaz pozitif, KKA ve ÇA’da küçük, mat, sarımsı kolonilerin enfeksiyon etkeni olduğu düşünülmüştür (Resim 2). EMB besiyerinde üreyen küçük, laktoz negatif kolonilerin belirginleşmesi için inkübasyon 72 saate çıkarılmıştır. Kültür plaklarından yapılan Gram boyama sonucunda görülen Gram-negatif

basil morfolojisindeki mikroorganizmanın (Resim 3) tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri VITEK-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemiyle gerçekleştirilmiş ve EUCAST’ın⁽⁸⁾ (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) “*Pseudomonas spp.*” yorumlama kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Üreticinin önerilerine uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonları, tanımlama için GN (BioMérieux, Fransa), antibiyotik duyarlılık testleri için AST-N326 (BioMérieux, Fransa) kartlarına ekilmiş ve otomatize sistemin inkübatör/okuyucu bölümüne yerleştirilmiştir. On sekiz saatlik inkübasyondan sonra, otomatize değerlendirme algoritmasına göre saptanan MİK (minimal inhibitör



Resim 2. *Brevundimonas vesicularis*'in sağdan sola sırayla KKA, ÇA ve EMB besiyerlerinde oluşturduğu koloni morfolojileri



Resim 3. *Brevundimonas vesicularis*'in kültür plaklarından yapılan gram boyalı incelemesi (100X immersiyon objektifi)

konsantrasyon) değerleri rapor olarak alınmıştır. *B. vesicularis* olarak tanımlanan mikroorganizmanın piperasiline (MİK ≤4 mg/L), piperasilin tazobaktama (MİK≤4 mg/L), seftazidime (MİK≤0.12 mg/L), sefepime (MİK≤0.12 mg/L), meropeneme (MİK≤0.25 mg/L), amikasinine (MİK≤2 mg/L) ve gentamisine (MİK≤1 mg/L) duyarlı olduğu saptanmıştır.

Hastaya seftazidim ve piperasilin tazobaktam tedavisi başlanmış, yineleyen kan kültürlerinde üreme olmadığı için teikoplanin tedavisi kesilmiştir. Trakeal aspirat kültüründe etkenin ürememesi, klinik olarak pnömoni tablosunun ve enfeksiyon parametrelerinin gerilemesi üzerine antibiyotik tedavisi 21. günde tamamlanmıştır.

Bu olgu sunumunda hastanın ebeveyninden (babası) yazılı onay alınmıştır.

TARTIŞMA

Son yıllarda hastanelerde Gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların sayısı gittikçe artmaktadır. Ayrıca, fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilecek Gram-negatif bakteriler de dikkat çekmektedir⁽³⁾. *B. vesicularis* ender olarak insan enfeksiyonlarına neden olan Gram-negatif, non-fermentatif basildir⁽⁷⁾. Literatürde bu bakterinin etken olduğu pnömoni, enfektif endokardit, spontan bakteriyel peritonit ve sepsisi de içeren az sayıda olgu yer almaktadır^(4,9).

Stabler ve ark.'nın⁽¹⁰⁾ çalışmasında, *B. vesicularis*, antibiyotik tedavisine yanıt alınamayan ve mekanik ventilasyon gerektiren solunum yetmezliği gelişen pnömoni olgusunun endotrakeal aspirat örneğinden izole edilmiş, ender görülen bir etken olmasına rağmen, sağlıklı erişkinlerde toplum kökenli pnömoniyeye neden olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada, prematürite, mekonyum aspirasyon sendromu ve akondroplaziye sekonder solunum yetmezliği nedeniyle mekanik ventilatöre bağlı

yenidoğanın trakeal aspirat örneğinden aynı etken izole edilmiştir. Hastanın kliniği, radyolojik bulguları ve pürülan örnekte saf üreme olması, bu bakterinin her yaşta hastanın solunum yollarında enfeksiyon etkeni olabileceğini ve mekanik ventilasyonun önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir.

Shang ve ark.'nın⁽⁷⁾ 2012 yılında yaptıkları çalışmada, biri T hücre lenfomalı, diğeri son dönem böbrek yetmezliği olan bağışıklığı baskılanmış iki hastanın kan kültürlerinden *B. vesicularis* izole edilmiş, yapılan literatür taramaları sonucunda bu etkenin bağışıklığı baskılanmış hastaların yanı sıra bağışıklığı yeterli hastalarda da etken olabileceği vurgulanmıştır. Tayvan'dan Yang ve ark.⁽¹¹⁾ tarafından bildirilen olguda subakut enfektif endokardit tanısı alan hastanın kan kültürlerinden *B. vesicularis* izole edilmiş ve enfeksiyon odağının dış apsisi olduğu düşünülmüştür. Yurt dışından bir başka çalışmada, ülkemizden bildiren *B. vesicularis*'e bağlı neonatal sepsis olgularına atıfta bulunularak ender karşılaşılan bu bakterinin yenidoğanlarda da önemli bir sepsis etkeni olabileceği dikkat çekilmiştir⁽⁴⁾.

Yapmış olduğumuz literatür taramaları sonucunda *B. vesicularis*'in antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için kullanılan yöntemlerin ve duyarlılık yorumlama kriterlerinin çalışmalar arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Pek çok çalışmada çalışmamızda olduğu gibi otomatize sistem veya Kirby–Bauer disk difüzyon yöntemi kullanıldığı gözlenmiştir^(3,5,7,10-12). Bunlardan farklı olarak, Yoo ve ark.'nın⁽²⁾ çalışmasında, gradient test, Lee ve ark.'nın⁽⁹⁾ çalışmasında ise agar dilüsyon yöntemiyle MİK belirlenmiştir. Zhang ve ark.'nın⁽¹³⁾ çalışmasında altta yatan çeşitli hastalıkları olan ve sepsis bulguları gelişen 22 hastanın kan kültürlerinden izole edilen *B. vesicularis* suşlarının antibiyotik duyarlılığı agar dilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Seftazidim ve trimetoprim-sulfametoksazolde direnç gözlenirken, imipenem ve piperasilin tazobaktamın yüksek duyarlılık oranlarıyla tedavide kullanılmaları önerilmiştir.

Brevundimonas vesicularis genellikle anti-pseudomonal penisilinlere, aminoglikozidlere ve karbapenem türü antibiyotiklere duyarlı olmakla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalarda bakterinin *in vitro* antibiyotik duyarlılığının değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir^(7,10,12). Bolzon ve ark.⁽³⁾ böbrek yetmezliği nedeniyle periton diyalizi yapılan hastada akut peritonit gelişmesi üzerine alınan periton sıvısı örneğinde üreyen *B. vesicularis* suşunun sefepim ve meropenem gibi antibiyotiklere dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu verilere benzer şekilde İtalya'dan bildirilen bir olgu sunumunda pilositik astrositom tanısıyla opere edilen ve menenjit kliniğiyle uyumlu semptomları olan hastadan alınan beyin omurilik sıvısı (BOS) örneğinden izole edilen *B. vesicularis*'in pek çok antibiyotiğe dirençli yalnızca siprofloksasine duyarlı olduğu rapor edilmiştir⁽¹²⁾. Başka bir çalışmada, yara kültüründen izole edilen *B. vesicularis*'in 2. ve 3. kuşak sefalosporinlere ve aminoglikozidlere dirençli iken, amoksisilin/klavulanat'a duyarlı olduğu ve bu antibiyotikle kür sağlandığı bildirilmiştir⁽⁵⁾. Bu bulguların aksine, Hindistan'da yapılan bir çalışmada, mekonyum aspirasyon sendromu tanısıyla izlenen yenidoğanın kan kültürlerinden izole edilen *B. vesicularis*'in meropenem, seftazidim, sefepim, piperasilin tazobaktam ve ampisilin sulbaktamı da içeren pek çok antibiyotiğe duyarlı olduğu bulunmuştur⁽⁴⁾. Bu bulgularla benzer şekilde, çalışmamızda yenidoğanın trakeal aspiratından izole ettiğimiz suş sefalosporinlere, piperasiline, piperasilin tazobaktama, aminoglikozidlere ve karbapenemlere duyarlı bulunmuştur. Yenidoğanlardan izole edilen suşlarda antibiyotik direncine rastlanmaması, yaşla birlikte antibiyotiklere maruziyetin artması ve buna bağlı direnç kazanılmasıyla ilgili olabilir. Çalışmamızda, seftazidim ve piperasilin tazobaktam tedavisi başlanan hastadan klinik olarak yanıt alınması ve laboratuvar sonuçlarının da uyumlu olması nedeniyle antibiyotik tedavisi 21 güne tamamlanmış ve sonlandırılmıştır.

Ender görülen ve zor üreyen bakterilerin tanımlanmasında ve doğrulanmasında kullanılan 16S rRNA gen sekans analizi hızlı ve güvenilir bir yöntemdir⁽⁷⁾. Lee ve ark.'nın⁽⁹⁾ çalışmasında,

bakteriyemisi olan 30 hastanın kan kültürlerinden izole edilen *Brevundimonas* türleri iki farklı ticari otomatize sistemle tanımlanmış, 16S rRNA gen sekans analiziyle doğrulanmıştır. Kore'den bildirilen olguda, karaciğer apsesinden alınan aspirat örneğinin kültüründen izole edilen etken otomatize sistemle önce *Sphingomonas paucimobilis* olarak tanımlanmıştır. Yapılan 16S rRNA gen sekans analiziyle *B. vesicularis* olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmayla konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistemle tanımlanan non fermentatif Gram-negatif basillerin 16S rRNA gen sekans analiziyle doğrulanmasının önemine dikkat çekilmiştir⁽²⁾. Çalışmamızda, *B. vesicularis*'in tanımlanması Shang ve ark.'nın⁽⁷⁾ çalışmasıyla benzer şekilde konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistemle yapılmıştır. Tanımlama aşamasında moleküler yöntemlerin kullanılmaması çalışmamızın kısıtlılığı olarak kabul edilmiştir.

Brevundimonas vesicularis enfeksiyonlu hastaların demografik ve klinik özellikleri Tablo 1'de listelenmiştir. Kan kültürlerinden izole edilen suşların olguların çoğunluğunu oluşturduğu ve invazif girişimle alınan örneklerden (BOS, periton sıvısı ve trakeal aspirat) izole edilen suşların bunları izlediği gözlenmiştir. Bu bulgulara göre hastanelerde invazif girişim yapılan hastalarda *B. vesicularis* gibi nadir görülen patojenlerin enfeksiyon etkeni olabileceği akılda tutulmalıdır. Gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi ve uygun tedavinin belirlenmesi için antibiyotik duyarlılık testlerinin kesinlikle yapılması gerekmektedir. Hastanelerde ortam temizliğine özen gösterilmesi ve sağlık çalışanları arasında hijyen kurallarına uyumun artırılması gibi enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması, fırsatçı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların önlenmesinde yararlı olacaktır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

Tablo 1. Literatürde *Brevundimonas vesicularis* kaynaklı enfeksiyon olguları

Kaynak	Yazar, yıl	Yaş	Cinsiyet	Tanı/alta yatan hastalık*	İzole edildiği örnek**	Tedavi/süre***
2	Yoo ve ark., 2012	30	Erkek	Karaciğer apsesi	Apse aspiratı	AM+SB/5 HAFTA
3	Bolzon ve ark., 2018	67	Erkek	Hipertansiyon, Son dönem KBY, periton diyalizi	Periton sıvısı	VAN +CRO/5 GÜN
4	Nandy ve ark., 2013	0	Kız	Mekonyum aspirasyon sendromu	Kan	TZP+GN+MEM /7 GÜN
5	Panasiti ve ark., 2008	71	Erkek	Travma, kutanöz enfeksiyon	Yara	AMC/2 HAFTA
7	Shang ve ark., 2012	83	Erkek	SLE, Son dönem KBY, Koroner arter bypass	Kan	CAZ/14 GÜN
7	Shang ve ark., 2012	25	Erkek	Anaplastik T hücre lenfoma,	Kan	VAN+FEP/5 GÜN, CRO/10 GÜN
10	Stabler ve ark., 2018	40	Erkek	Toplum kökenli pnömoni	Trakeal aspirat	TZP/14 GÜN
11	Yang ve ark., 2006	40	Erkek	Diş apsesi/Subakut enfektif endokardit	Kan	CRO+GN/7 GÜN GN+CIP/1 AY
12	Mondello ve ark., 2006	24	Erkek	Pilositik astrositom	BOS	CIP +AK/15 GÜN
Bu çalışma	Gündem ve ark., 2022	0	Kız	Mekonyum aspirasyon sendromu, Prematürite	Trakeal aspirat	CAZ+TZP/21 GÜN

*SLE: Sistemik lupus eritematosus, KBY: Kronik böbrek yetmezliği, **BOS: Beyin omurilik sıvısı, ***CRO: Seftriakson, GN: Gentamisin, AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, AMC: Amoksisilin/klavulanat, CAZ: Seftazidim, TZP: Piperasilin tazobaktam, AM: Ampisilin, VAN: Vankomisin, AM-SB: Ampisilin /sulbaktam; FEP: Sefepim, MEM: Meropenem.

KAYNAKLAR

- Ryan MP, Pembroke JT. *Brevundimonas spp*: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*. 2018;9(1):480-93. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1419116>
- Yoo SH, Kim MJ, Roh KH, et al. Liver abscess caused by *Brevundimonas vesicularis* in an immunocompetent patient. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 10):1476-9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045120-0>.
- Bolzon C, Nguyen BH. A rare case of peritonitis due to *Brevundimonas vesicularis*. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2018;8(3):161-2. <https://doi.org/10.1080/20009666.2018.1478564>
- Nandy S, Das AK, Dudeja M, Tiwari R, Alam S. *Brevundimonas vesicularis* bacteremia in a neonate: A rare case report. *Natl J Integr Res Med*. 2013;4(3):170-2.
- Panasiti V, Devirgiliis V, Mancini M, et al. Cutaneous infection caused by *Brevundimonas vesicularis*: A case report. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(2):457-61. <https://doi.org/10.1177/039463200802100226>
- Lu B, Shi Y, Zhu F, Xu X. Pleuritis due to *Brevundimonas diminuta* in a previously healthy man. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 3):479-82. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045013-0>
- Shang ST, Chiu SK, Chan MC, et al. Invasive *Brevundimonas vesicularis* bacteremia: two case reports and review of the literature. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012;45(6):468-72. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.12.021>
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version:10, 01.01.2020.
- Lee MR, Huang YT, Liao CH, et al. Bacteremia caused by *Brevundimonas species* at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000-2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(10):1185-91. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1210-5>
- Stabler SN, Mack B, McCormack G, Cheng MP. *Brevundimonas vesicularis* causing bilateral pneumosepsis in an immunocompetent adult: A case report and literature review. *Can J Hosp Pharm*. 2018;71(3):208-10.

11. Yang ML, Chen YH, Chen TC, Lin WR, Lin CY, Lu PL. Case report: infective endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. BMC Infect Dis. 2006;6:179-85.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-179>
12. Mondello P, Ferrari L, Carnevale G. Nosocomial *Brevundimonas vesicularis* meningitis. Infez Med. 2006;14(4):235-7.
13. Zhang CC, Hsu HJ, Li CM. *Brevundimonas vesicularis* bacteremia resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime in a tertiary hospital in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2012;45(6):448-52.
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.01.010>

YAZARLARA BİLGİ

- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin yayın organı olup ilgili alanlardaki özgün araştırma, derleme, olgu sunumu, bilimsel haberler, bilimsel kitap ve dergi tanıtım yazıları ile okuyucu mektuplarını yayımlayan hakemli bir dergidir.
- Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık olmak üzere üç ayda bir çıkar ve dört sayıda bir cilt tamamlanır.
- Yazılar Türkçe olarak yollanmalıdır.
- Yazıların sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yayımlanması istenen metnin dayandığı çalışma, daha önce bir yerde yayımlanmamış ya da yayımlamak üzere teslim edilmiş veya kabul edilmiş olmamalıdır. Özet biçiminde yayımlanmış bir ön bildirin bitmiş biçimine yer verilebilir.
- Dergiye gönderilen yazılar, ilk olarak dergi standartları açısından incelenir. Derginin istediği forma uymayan yazılar, daha ileri bir incelemeye gerek görülmeksizin yazarlarına iade edilir. Bu nedenle gereksiz yere zaman ve emek kaybına yol açılmaması için, yazı sahipleri dergi kurallarını dikkatli incelemek zorundadır.
- Dergi kurallarına uygunluğuna karar verilen yazılar Danışma Kurulundan veya konu ile ilgili kişilerden en az iki hakeme gönderilir ve hakemlerden yayına uygun olup olmadığı konusunda görüşleri alınır. Düzeltme isteniyorsa tekrar yazara gönderilir. Bu incelemeden geçen yazılar, Yayın Kurulu tarafından tekrar değerlendirilir ve basılacağı yer ve sayı kararlaştırılır.
- Danışma ve Yayın Kurulları; düzeltme, kontrol ve dizgi aşamasında yayıncı, yazılarda düzeltme yapmak, biçiminde değişiklikler istemek ve yazarları bilgilendirerek kısaltma yapmak yetkisine sahiptir. Yazarlardan istenen değişiklik ve düzeltmeler yapılanaya 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 uyuşmalıdır.
- On-line ilgili formlarda tüm aşamalar doldurulmalıdır
- Araştırma daha önce bir bilimsel toplantıda bildiri (sözlü veya poster) olarak sunulmuş ise, bu bilgi toplantının adı ve tarihiyle birlikte belirtilmelidir.
- Olgu sunumu, derleme, editöre mektup gibi diğer metin çeşitlerinde bölümlü özet hazırlamaya gerek yoktur.
- Özet bölümünde kısaltmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalı ve kaynak, şekil, tablo ve atf yer almamalıdır.
- Ana metin sayfaları, metin çeşidine göre bölümlendirilmelidir. Özgün araştırmalar amacın belirtildiği giriş, gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma kısımlarından oluşmalıdır. Bulgu ve tartışmanın kısa olduğu metinlerde iki başlık birleştirilerek de aktarılabilir. Olgu sunumu amacın belirtildiği kısa bir girişten sonra detaylı olgu ve tartışmadan oluşmalıdır. Derlemelerde önce kısa bir giriş yapılmalıdır ve ardından derlemenin konusuna uygun oluşturulmuş bölümleri kapsamalıdır.
- Mikroorganizma adları ve MİK veya PFGE gibi kısaltmalar ilk kullanıldıklarında tam olarak, açık şekilleriyle yazılmalı mikroorganizma adı daha sonraki kullanımlarda cins adının ilk harfi kullanılarak kısaltılmalıdır. *Staphylococcus aureus S. aureus* gibi. Paragraf başında ise bu kısaltma kullanılmamalı, isim tam olarak yazılmalıdır.
- *Escherichia coli* ve *Entamoeba coli* gibi, kısaltmaları aynı olacak adlar aynı yazıda geçtiğinde yazı boyunca kısaltılmadan kullanılmalıdır. Stafilokok, streptokok gibi sadece cins adı geçen cümlelerde dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir.
- Yanında birim gösterilmeyen ondan küçük sayılar yazı ile yazılmalı, rakam ile yazılan sayılara takılar kesme işareti ile eklenmelidir. Üç hasta suşların 28'i gibi. Mümkün olduğunca cümlelere sayılarla başlanmamalıdır.
- Boyama yöntemi olan Gram büyük harfle yazılmalıdır. Bakteri tanımlamasında ise küçük harf kullanılmalıdır. Örneğin gram negatif kok yazılmalıdır. Negatif / pozitif kelimeleri açık olarak yazılmalı; (-) veya (+) kısaltmaları kullanılmamalıdır.

- Bir teşekkür yazısı varsa Kaynaklar'dan önce olmalıdır.
- Çalışma kazanılmış bir burs veya proje ile tamamlanmışsa belirtilmelidir.
- Kaynaklar listesinde yer alan kaynakların tamamının metin içinde kullanılmış olması gereklidir.
- Kaynaklar metin içinde geçiş sırasına göre sıralanmalı ve metin içinde cümle sonuna konacak parantez içine, üst simge olarak yazılmalıdır. Örneğin; gösterilmiştir^(1,5,6).....Kaynak yazımı sırasında boşluk bırakmayınız
- Metinde kaynaklar üst simge olarak bulunmalıdır
- Metinde kaynak verilirken yazar adı kullanılıyorsa kaynak numarası yazar adının yanına yazılmalıdır. Örneğin; Smith ve Gordon'a⁽⁴⁾ göre Kaynak yazımı sırasında boşluk bırakmayınız
- Henüz yayınlanmamış veriler ve çalışmalar Kaynaklar bölümünde yer almamalıdır.
- Dergimiz, başka çalışmalarda bildirilen kaynakların aktarma şekline 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:** 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:** Başustaoğlu AC, Süzük S, Mumcuoğlu İ, ve ark. Kan kültürü uygulamalarının değerlendirilmesi: EpiCenter verilerinin kullanımı. XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya; 2016:TPS-85.
- **Tez:** Öktem İMA. Endoservikal sürüntü örneklerinde Chlamydia trachomatis hücre kültürü sonuçlarının direk floresan antikor (DFA) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile karşılaştırılması [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 1998.

C. Sanal Ortam

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

Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

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

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

ETİK POLİTİKALAR

Yayın Etiği

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi yayın süreçleri, bilginin tarafsız ve saygın bir şekilde oluşturulması ve yayımlanmasını ilke olarak benimsemiştir. Bilimsel bir çalışmayı ortaya koyan tüm paydaşların (yazar, editör, hakem, yayıncı ve okuyucu), bilimin doğru bir şekilde ilerlemesine katkı sağlaması hedeflendiğinden, hazırlanan bilimsel çalışmaların bilimsel etik ilkelere uygunluğuna önem verilmektedir. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisinin tüm paydaşlarının aşağıdaki yayın etiği ilkelerine uyması beklenmektedir. Bu etik ilkeler, COPE (Committee on Publication Ethics) ve ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) tarafından hazırlanan yönerge ve akışlar dikkate alınarak hazırlanmıştır. Aşağıda belirtilen etik ilkeler haricinde kalan konu ve durumlar için COPE ve ICMJE'nin rehberleri esas alınır.

Yazarların Etik Sorumlulukları

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisine makale gönderen yazarların aşağıda belirtilen etik ilkelere uyması beklenmektedir.

- Makalenin bilimsel ve etik kurallara uygunluğu yazarların sorumluluğundadır. Yazarın çalışmayla ilişkili verilerin doğruluğundan emin olması, araştırmasına ilişkin kayıtlarını düzenli tutması ve olası bir istek üzerine bu verilere erişim sağlayabilmesi gerekir.
- Yazarların gönderdikleri çalışmaların özgün olması beklenmektedir. Başka çalışmalardan yararlanmaları durumunda eksiksiz ve doğru bir biçimde atıfta bulunmaları ve/veya alıntı yapmaları gerekmektedir.
- Yazarlar gönderdiği makalenin başka bir yerde yayınlanmadığından veya kabul edilmediğinden emin olmalıdır.
- Yazar listesinde yer alan kişilerin tümü, çalışmanın yürütülmesi ve yayımlanması sürecinde yazarlık katkısı sunmuş olması gerekmektedir. Yazarlık ölçütlerini tam karşılamayan ve çalışmaya katkı sağlayanlar varsa teşekkür bölümünde belirtilmelidir.
- Çok yazarlı makalelerde yazarların araştırmaya katkıları (fikir oluşturma, çalışmanın tasarımı, uygulama, istatistik, yazımı gibi) telif hakkı devir formunda belirtilerek, editör kuruluna iletilmelidir.
- Yazarların isim sıralaması ortak verilen bir kararla belirlenmelidir. Tüm yazarlar yazar sıralamasını Telif Hakkı Devir Formu'nda imzalı olarak belirtmek zorundadır. Dergiye makale gönderildikten sonra yazarlardan hiçbirinin ismi, tüm yazarların yazılı izni olmadığı sürece yazar listesinden silinemez veya yeni bir isim yazar olarak eklenemez. Ayrıca telif hakkı devir formunda belirtilen yazar sırası değiştirilemez.
- Makalenin gönderim aşamasında, Telif Hakkı Devir Formu'nun imzalı ve taranmış hali dergi yönetim sistemine (<http://www.journalagent.com/tmcd/>) yüklenmesi gerekmektedir.
- Makaleyle ilgili etik kurul onayı, katılımcılardan alınan bilgilendirilmiş onamlar ve araştırma etiği uygulamalarının ayrıntıları, makalenin "Yöntem" kısmında açıkça belirtilmelidir. İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda etik kurul onayının alınması gerekmektedir. Başvuru esnasında etik kurul onayının sisteme (<http://www.journalagent.com/tmcd/>) yüklenmesi zorunludur.
- İnsan veya hayvan denek içeren tüm çalışmalar için ulusal ve uluslararası yasalara ve yönergelere uygun olarak, (örneğin, WMA Helsinki Bildirgesi, NIH Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına İlişkin Politika, Hayvanların Kullanımına İlişkin AB Direktifi ile T.C. Sağlık Bakanlığı'nın ilgili yönetmeliklerine uygun olarak) gerekli onayların alındığının belirtilmesi, denek mahremiyetine saygı gösterilmesi gerekmektedir.
- Herhangi bir çıkar çatışması durumunda veya makaleyle ilgili etik bir ihlal belirlendiğinde, bu durum editör ve yayıncı ile paylaşılmalı ve bu durum editör kuruluna başlık sayfasında ve kaynaklardan önce belirtilen 'Çıkar çatışması' başlığı altında açıklanmalıdır.
- Araştırma için alınmış finansal destek, bağış vb. yardım söz konusu ise araştırma sonunda Destekleyenler başlığı altında belirtilmelidir.
- Yazarların yayımlanmış, erken görünüm veya değerlendirme aşamasındaki çalışmasıyla ilgili yanlış bir durumu fark etmesi durumunda, dergi editörünü veya yayıncıyı bilgilendirmesi, düzeltme veya geri çekme işlemlerinde editörlerle işbirliği yapma yükümlülüğü bulunmaktadır.

Editörlerin Etik Sorumlulukları

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi editör ve editör yardımcılarının aşağıdaki etik ilke ve sorumlulukları yerine getirmesi gerekmektedir.

- Editörler, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisinde yayınlanan her yayından sorumlu olup bu bağlamda; okuyucu ve yazarların bilgi gereksinimlerini karşılama, derginin sürekli olarak gelişimini sağlama, dergide yayınlanan çalışmaların kalitesini artırma, yayın süreçlerine ilişkin açıklık ve şeffaflığı sağlama, etik ilkeleri dikkate alarak tüm süreçleri yürütmeye gibi rol ve yükümlülükleri yerine getirmek zorundadırlar.
- Editörler, makalelerin içerik ve yayın sürecindeki kalitesinden sorumlu olup hatalı durumlarda gerekli düzeltmelerin yapılmasını sağlar.
- Editörler, hakemlerin, çalışmalarını tarafsız ve bağımsız olarak değerlendirmelerini sağlama, yeni hakem belirlerken niteliklerini dikkate alma, derginin yayın politikaları ve gelişimine ilişkin sürekli etkileşim içerisinde olma, gerektiğinde bilgi ve eğitim toplantıları yapma gibi yükümlülükleri yerine getirmelidir.
- Editörler, yazarların etnik kökeni, cinsiyeti, uyruğu, dini ve siyasi özelliklerinden bağımsız olarak, dengeli, yansız ve adil şekilde makaleleri değerlendirmekle yükümlüdür.
- Editörler, sisteme yüklenen makalelere ilişkin tüm bilgileri, makale yayınlanana kadar gizli tutmak zorundadır. Ayrıca, yazarlara açıklayıcı ve bilgilendirici şekilde geri bildirim vermelidir.
- Editörler, etik ihlale ilişkin bir şikayet olması durumunda, COPE'un iş akışlarını dikkate alır.
- Editörler, hakem atama konusunda tam yetkili olup yazarlar, editörler ve hakemler arasında çıkar çatışmasını korur.
- Editörler, hakem havuzunun genişletilmesi, makalenin konu alanına uygun hakemi atamaya özen gösterilmesi, kör hakemlik sürecinde hakem bilgilerinin gizliliğini sağlama, değerlendirme sürecinin tarafsız, bilimsel ve nesnel bir şekilde yapılabilmesi için gerekli bilgi ve

desteği sağlama, hakem performansını artırmaya yönelik uygulama ve politikaların belirlenmesi gibi çalışmaları yerine getirmelidir.

- Editörler, değerlendirilen çalışmalarda yer alan deneklere veya gorsellere ilişkin kişisel verilerin korunmasını sağlamakla yükümlüdür. Çalışmada kullanılan deneklerin/ katılımcıların, açık onayının alındığının belgeli olmadığı durumda çalışmayı reddetmek hakkına sahiptir.
- Editörler, yayınlanan tüm makalelerin fikri mülkiyet hakkını korumakla, olası ihlallerde derginin ve yazarların haklarını savunmakla yükümlüdür.
- Editörler, yazarlar, hakemler ve diğer editörler arasındaki olası çıkar çatışmalarını göz önünde bulundurarak, çalışmaların yayın sürecinin bağımsız ve tarafsız bir şekilde tamamlaması için gerekli önlemleri alır ve saptanan durumlar varsa etik ilkeler doğrultusunda değerlendirir.

Hakemlerin Etik Sorumlulukları

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisine gönderilen tüm çalışmalar, nesnel ve bağımsız değerlendirilme olanağı sağlaması nedeniyle "ift Kör Hakemlik" yöntemiyle değerlendirilmektedir. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi için değerlendirme yapan hakemlerin aşağıdaki etik ilkeler uyması beklenmektedir.

- Hakemler, makaleleri değerlendirirken, yazarların etnik kökeni, cinsiyeti, uyruğu, dini ve siyasi özelliklerinden bağımsız şekilde, zamanında inceleyerek, tarafsız bir değerlendirme yapmalıdır.
- Hakemler, makale ile ilgili çalışmaları bilerek, herhangi bir telif hakkı ihlali veya intihal fark ettiğinde editöre raporlandırmalıdır.
- Hakemler, gönderilen makaleye ilişkin tüm bilgileri gizli tutmalıdır.
- Hakemler, makaleye ilişkin kendini yetkin hissetmediğinde veya geri dönüş için yeterli zamanı olmadığında, editörlere belirtmelidir.

- Hakemler, makalenin kalitesini yükseltmeye yardımcı olacak yönlendirmelerde bulunmalı, çalışmayı titizlikle inceleyerek, yorumlarını yapıcı ve nazik bir dille ifade etmelidir.
- Hakemlerin, makaleyi üçüncü kişilerle paylaşmamaları gerekir.
- Gizlilik ilkesi gereği hakemler, değerlendirme süreci tamamlandıktan sonra makalelerin kopyalarını yok etmelidir.
- Hakemler, potansiyel çıkar çatışmalarının (mali, kurumsal, işbirlikçi ya da yazar/yazarlar arasındaki diğer ilişkiler) farkında olmalı ve gerekirse bu konuda editörleri uyarmalıdır.

Yayıncının Etik Sorumlulukları

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin resmi yayın organıdır. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi cemiyetin kuruluş amacı doğrultusunda meslek üyelerinin akademik gelişimine katkı sağlamak üzere, kar amacı gütmeyen ve kamu yararı gözetilerek yayımlanmaktadır. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kurulu, derginin yayın süreçlerine ilişkin olarak aşağıdaki etik sorumlulukların bilincindedir.

- Bilimsel bir çalışmada görev alan tüm paydaşlar gibi yayıncı olarak, tüm etik ilkeler kapsamında hareket eder.
- Yayımlanan her makalenin telif hakkının korunması ve yayınlanmış her makalenin arşivlenmesi görevini üstlenir.
- Bağımsız editör kararının oluşturulmasını güvenceye alarak, ekonomik veya politik kazançları gözetmeksizin tüm yayın sürecinde editörlerin son karar verici olmalarına olanak sağlar.
- Kişilerin etik olmayan bir durumla (sahtecilik, çarpıtma, dilimleme, sahte yazarlık vb.) karşılaşmaları durumunda çekinmeden yayıncı veya editörlerle iletişime geçmeleri için olanak sağlar.

HAKEMLERE BİLGİ

“Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi” hakemli bir dergidir. İncelemeye alınan her çalışma; hakemler ve editörler tarafından değerlendirilir.

Hakem daveti

- Derginin editörler kurulu, farklı bölümleri inceleyen “Bölüm Editörleri”nden oluşur. Gönderilen her makale başeditör tarafından ilgili bölüm editörüne aktarılır. İlgili bölüm editörü, kendi alanında uzmanlaşmış, ulusal ve uluslararası dergilerde inceleyeceği çalışma ile ilgili güncel yayınları olan en az iki bilim insanımıza “hakem daveti”ni on-line başvuru sistemi üzerinden gönderir.
- Hakemlerimizin kendilerine gönderilen davet yazısını, online sistem üzerinden bir hafta içinde “Değerlendirme kabul” veya “Değerlendirme red” olarak cevaplaması beklenmektedir. Değerlendirmenin hakem tarafından kabul edilmediği durumlarda ilgili gerekçenin yazılması beklenmektedir. Bu gerekçe ileriki dönemlerde hakem davetindeki muhtemel sorunları engelleyecektir.
- Hakemlerin kendilerine gönderilen yazılarda yazar(lar) ile ve/veya finansal konuda çıkar çatışması olmamalıdır. Çalışmalar tarafsız ve nesnel değerlendirilmelidir.
- Değerlendirmeyi kabul eden hakemlerimiz için inceleme süresi 20 (yirmi) gündür. Bu süre içinde gecikme olması durumunda hakemlere ek olarak 7 (yedi) gün süre bölüm editörü tarafından verilebilir. Bu sürede değerlendirilmesini göndermeyen hakemimiz ilgili çalışma için hakem panelinden çıkarılır.

Makalelerin genel değerlendirilmesi;

- Makale derginin kapsamına bilimsel olarak uygun mudur?
- Makale etik kural ve ilkelere uygun mudur?
- Çalışmanın konusu güncel midir? Bu makalenin kabulü için öne çıkarılan konular vurgulanmış mıdır?
- Alanında katkı sağlayacak özgünlüğü var mıdır?
- Hipotezi açık olarak belirtilmiş midir? Bu hipotez, uygun olarak araştırmaya alınmış mıdır?
- Araştırmanın yöntem ve sonuçları uygun olarak planlanmış, test edilmiş ve raporlanmış mıdır?
- Elde edilen sonuçlar uygun şekilde hipotez kapsamında değerlendirilerek yazılmış mıdır?
- Çalışmanın kısıtlılıkları –varsa- eklenmiş midir?
- Makalenin yazımında güncel kaynaklar (Türkçe ve/veya yabancı dilde) yeterince kullanılmış mıdır?
- Makale düzgün ve akıcı Türkçe ile yazılmış mıdır?
- Makale içinde intihal ve/veya kişisel hakların ihlali olarak değerlendirilebilecek yazı, resim, şekil vb var mıdır?

Derlemelerin değerlendirilmesi

- Derleme konusu güncel midir? Bu derlemenin, konusunda ilgili okuyucuya katkısı var mıdır?
- Derleme düzgün ve akıcı Türkçe ile yazılmış mıdır?
- Derleme içinde intihal ve/veya kişisel hakların ihlali olarak değerlendirilebilecek yazı, resim, şekil vb var mıdır?
- Kullanılan kaynaklar az veya fazla mıdır? Gereksiz kaynak kullanımı var mıdır? Kullanılan kaynaklar (Türkçe ve/veya yabancı dilde) güncel midir?

Olgu sunumu değerlendirilmesi

- Olgu sunumu konusu güncel midir? Bu olgu sunumunun, konusunda ilgili okuyucuya katkısı belirtilmiş midir?
- Kullanılan kaynaklar (Türkçe ve/veya yabancı dilde) güncel midir?
- Olgu sunumu düzgün ve akıcı Türkçe ile yazılmış mıdır?
- Derleme içinde intihal ve/veya kişisel hakların ihlali olarak değerlendirilebilecek yazı, resim, şekil vb var mıdır?

Çevresel araştırmalar

- Çevresel araştırmalar için yasal/özel izin alınacak bir yöntem uygulanmış mıdır?
- Gerekli olduğu durumlarda gerekli izinler mevzuatın belirlediği kurumlardan alınmış mıdır?
- Kamu/özel kurum ve kuruluşlarından kamuya açık olmayan bilgi, belge vb. veriler var mıdır?
- Çalışma; tarihi eserler, arkeolojik alanlar, askeri bölgeler vb. alanlar veya korunma altına alınmış yer altı, yer üstü ve su altı alanlarında yürütülen araştırma ve çalışmalar için yetkili kurum ve kuruluşların iznine bağlanan araştırmalar kapsamında mıdır?
- İlgili mevzuatın yetkili kurum ve kuruluşların iznine bağladığı mikroorganizma örneklerinin toplanmasını içermekte midir?

Hakem raporu

- Hakemler kendilerine gönderilen çalışmalarını gizli tutmalıdır. Makaleyi kendisi ile birlikte değerlendiren bilim insanı varsa (mentor, asistan vb) bu durum hakem raporunda “Editör için yorumlar” bölümünde açık isim olarak belirtilmelidir.
- Rapor “değerlendirme bilgi formu”, “Yazar için yorumlar” ve “Editör için yorumlar” bölümünden oluşur. Raporun hazırlanmasında etik konulara dikkat edilmeli, kişisel ifade ve imalardan kaçınılmalı, akıcı ve anlaşılır bir dil kullanılmalıdır.
- Yazarlar için yorumları yazarken, hakemlerin kendi adlarını yazmamaları önerilir.

