

Cilt / Volume 53

Sayı / Number 4

Aralık / December 2023

ISSN 0258-2171

e-ISSN 2458-7516



Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✓ **Lepra: İhmal Edilmiş Eski Bir Hastalık**
- ✓ **Asemptomatik Hastalarda SARS-CoV-2 PCR Pozitiflik Oranları ve COVID-19 Aşılarının Asemptomatik Enfeksiyon Üzerindeki Etkisi**
- ✓ **Ağız Çalkantı Suyunda *Candida* Türlerinin Belirlenmesinde Real-Time PCR Testinin Tanı Değeri**
- ✓ **Yoğun Bakım Ünitelerinden Beş Yıllık Bir Analiz: Kan Kültürlerinden Soyutlanan *Escherichia coli* Antibiyotik Direnci Ne Durumda?**

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY



Cilt / Volume 53

Sayı / Number 4

Aralık / December 2023



TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 53 Sayı / Number 4 Aralık / December 2023

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

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, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 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; Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
0000-0002-4820-6986

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

Sahibi / Owner

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

Prof. Dr. Candan Çiçek

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
yılada 4 kez yayınlanır.*

© 2023. Bu dergide yer alan yazı, makale, fotoğraf ve illüstrasyonların elektronik ortamlarda dahil olmak üzere kullanma ve çoğaltılma hakları Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği'ne aittir. Yazılı ön izin olmaksızın materyallerin tamamının ya da bir bölümünün çoğaltılması yasaktır. Dergi Basım Meslek İlkeleri'ne uymaktadır.

© 2023. 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

Yayınçılık 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

Ayça Arzu Sayiner, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
0000-0001-6750-2353

Aylin Cemile Erman Daloğlu, Sağlık Bilimleri Üniversitesi,
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Laboratuvarı, Antalya
0000-0003-0120-3830

Aylin Döğen, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
0000-0002-0388-306X

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

Ayşe Semra Güreser, Sağlık Bilimleri Üniversitesi,
Dr.Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
0000-0002-6455-5932

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

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

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

Evren Doruk Engin, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji
Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0001-9209-8858

Fatma Kalem, Konya Numune Hastanesi, Mikrobiyoloji
Laboratuvarı, Konya
0000-0002-0191-0917

Gülden Çelik, Bahçeşehir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0001-8700-9865

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

Gülnaz Çulha, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay
0000-0003-1034-132X

Harun Ağca, Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa
0000-0002-2651-2034

Hatice Ertağlar, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın
0000-0001-7997-6433

Hüseyin Gündüğüoğlu, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne
0000-0003-1048-8268

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

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

Özgür Kurt, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0001-5575-588X

Pınar Işkın Zarakol, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı, Ankara
0000-0003-4918-4085

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

Sevgi Ergin, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
0000-0003-2039-3078

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

Tuğrul Hoşbul, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp
Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
0000-0002-0150-4417

Tülin Demir, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji
Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara
0000-0003-2708-2838

Ülküye Dudu Gül, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi, Biyoproses Mühendisliği Ana Bilim
Dalı, Bilecik
0000-0001-6443-1633

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

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



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

DERLEME / REVIEW

- **Lepra: İhmal Edilmiş Eski Bir Hastalık**
Leprosy: An Ancient Neglected Disease
Gönül Aslan205

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / RESEARCH ARTICLES

- **Asemptomatik Hastalarda SARS-CoV-2 PCR Pozitiflik Oranları ve COVID-19 Aşılarının Asemptomatik Enfeksiyon Üzerindeki Etkisi**
SARS-CoV-2 PCR Positivity Rates in Asymptomatic Patients and the Effect of COVID-19 Vaccines on Asymptomatic Infection
Yasemin Çakır, Gizem Soydan Görgülü220
- **Rekombinant Cryptostatin Proteininin ve Cryptopain 1 Sistein Proteazının Aktivitelerinin Belirlenmesi**
Determination of the Activities of Recombinant Cryptostatin Protein and Cryptopain 1 Cysteine Protease
Zeynep Erdem Aynur, Bülent Bozdoğan.....227
- **2018-2021 Yılları Arasında Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi'nde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilerin Tür Dağılımı ve Gram Negatif Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları**
Species Distribution of Bacteria Isolated From Blood Cultures and Antibiotic Susceptibilities of Gram Negative Bacteria in Prof. Dr. Süleyman Yalçın City Hospital Between 2018-2021
Şule Çetin, Tuncer Özekinci, Merve Özmen, Abdurrahman Sarıms, Mücahide Esra Koçoğlu237
- **Ağız Çalkantı Suyunda *Candida* Türlerinin Belirlenmesinde Real-Time PCR Testinin Tanı Değeri**
Diagnostic Value of The Real-Time PCR Test for The Identification of Candida Species in Oral Rinse Solutions
Petek Çürük, Ayşe Sultan Karakoyun, Nevzat Ünal, Şehnaz Yılmaz, M. Emre Benlidayı, Ertan Kara, M. Macit İlkit245
- **Kistik Ekinokokkoz Şüpheli Hastaların Tanısında İndirekt Hemagglütinasyon ve İmmünokromatografik Yöntemin Karşılaştırılması**
The Comparison of Indirect Hemagglutination and Immunochromatographic Methods In Diagnosis of Patients with Cystic Echinococcosis Doubt
Duygu Öztaş, Fahriye Ekşi, Tekin Karslıgil.....258
- **Yoğun Bakım Ünitelerinden Beş Yıllık Bir Analiz: Kan Kültürlerinden Soyutlanan *Escherichia coli* Antibiyotik Direnci Ne Durumda?**
A Five-Year Analysis from Intensive Care Units: What is the Current Situation of Antibiotic Resistance of Escherichia coli Isolated from Blood Cultures?
İsmail Selçuk Aygar, Zehra Leyla Yapalak, Ayşe Korkmaz Akyüz, Kübra Atılan, Kemal Tekin265
- **Bir Üniversite Hastanesine Başvuran Kadın Hastalarda Yüksek Riskli HPV Sıklığı ve Genotip Dağılımı Sonuçlarının 3 Yıllık Retrospektif Analizi**
Retrospective Analysis of The 3-Year Outcomes of High-Risk HPV Frequency and Genotype Distribution in Female Patients Admitted to A University Hospital
Salim Yakut, Nesrin Gareayaghi, Fadile Yıldız Zeyrek, Arjen Ulaba, Mehmet Demirci, Akın Yiğın272



TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 53 Sayı / Number 4 Aralık / December 2023

- **Ticari Dizel Yağının Çevresel Mikroorganizmalar ile Bozunması Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi**
Determination of the Efficacy of Commercial Diesel Oil on Degradation by Environmental Microorganisms
Cansu Vural.....278

OLGU SUNUMU / CASE REPORT

- **Yetişkin Bir Hastada *Streptococcus agalactiae* Nedenli Yumuşak Doku Enfeksiyonu ve Sonrasında Gelişen Bakteriyemi Olgusu**
A Case of Soft Tissue Infection Caused by Streptococcus agalactiae and Subsequent Bacteremia in an Adult Patient
Merve Cihan, Emel Duyar287
- YAZARLARA BİLGİVI-VII
- ETİK POLİTİKALARVIII-IX
- HAKEMLERE BİLGİX

Lepra: İhmal Edilmiş Eski Bir Hastalık

Leprosy: An Ancient Neglected Disease

Gönül Aslan[✉]

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

Atıf/Cite as: Aslan G. Lepra: İhmal Edilmiş Eski Bir Hastalık. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):205-219.

Öz

Lepra veya Hansen hastalığı, aside dayanıklı bir basil olan *Mycobacterium leprae*'nin neden olduğu deri, periferik sinirler ve üst solunum yolu mukozasını tutan kronik granümatöz bir enfeksiyondur. Lepra, doku hasarı ve periferik sinirlerde demiyelinizan lezyonlarla karakterize eski, insi ve ihmal edilmiş bir hastalıktır. Bir zamanlar Avrupa ve Asya'da görülen lepra günümüzde çoğunlukla sıcak ılıman tropikal iklime sahip gelişmekte olan ve fakir ülkelerde olmak üzere 105 ülkede endemik olarak görülmektedir. *M. leprae*'ya karşı konak bağışıklığı, Th1 tipi sitokinlerin güçlü üretimine sahip tüberküloid lepradan, Th2 tipi sitokinlerin yüksek seviyeleri ve suboptimal proinflatuar yanıt ile karakterize edilen lepromatöz lepraya kadar farklı klinik paternler şeklinde görülür. Lepra tanısında klinik bulguların yanı sıra, lezyonların aktif kenarından yapılan biyopsilerin histopatolojik, bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmesi ve lepromin deri testi kullanılmaktadır. Bu derleme ile Dr. Gerhard-Henrik Armauer Hansen'in *M. leprae*'yi keşfinin 150. yılı anısına, farkındalık yaratmak, halen dünyanın 136 ülkesinde görülen, unutulmuş ve ihmal edilen lepra hastalığı patogenezi ve mikrobiyolojik tanısında güncel bilgilerin gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium leprae*, tarihçe, lepra patogenezi, bulaşma, sınıflandırma, tanı, tedavi

ABSTRACT

Leprosy or Hansen's disease is a chronic granulomatous infection of the skin, peripheral nerves and upper respiratory tract mucosa caused by *Mycobacterium leprae*, an acid-fast bacillus. Leprosy is an old insidious and neglected disease characterized by tissue damage and demyelinating lesions in peripheral nerves. Leprosy, which was once seen in Europe and Asia, is now endemic in 105 countries, mostly in developing and poor countries with warm temperate tropical climates. Host immunity against *M. leprae* appears in different clinical patterns, from tuberculoid leprosy with strong production of Th1-type cytokines to lepromatous disease characterized by high levels of Th2-type cytokines and a suboptimal proinflammatory response. In the diagnosis of leprosy, clinical findings, examination of biopsies from the active edge of the lesions by histopathological, bacteriological and molecular methods, and lepromin skin test are used. The aim of this review is to raise awareness to commemorate the 150th anniversary of Dr. Gerhard-Henrik Armauer Hansen's discovery of *M. leprae* and review the current information on the pathogenesis and microbiological diagnosis of leprosy, the forgotten and neglected disease, which is still seen in 136 countries of the world.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, history, pathogenesis of leprosy, transmission, classification, diagnosis, treatment

Alındığı tarih / Received:

18.03.2023 / 18.March.2023

Kabul tarihi / Accepted:

05.07.2023 / 05.July.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

G. Aslan 0000-0002-1380-0379

✉ drgaslan@gmail.com

GİRİŞ

Lepra veya cüzam hastalığı, *Mycobacterium leprae*'nin neden olduğu esas olarak cilt, periferik sinirler ve üst solunum yolu mukozasını etkileyen, kronik, tedavi edilebilir bulaşıcı bir hastalıktır⁽¹⁾.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından gelişmekte olan ülkelerde büyük bir tehdit olarak kabul edilen altı hastalıktan biridir. Tedavi edilebilir olmasına rağmen

lepra, genellikle geç veya yanlış teşhis nedeniyle ciddi, yaşam boyu süren sakatlıklara ve şekil bozukluklarına neden olmaktadır. Her yıl yaklaşık 200.000 yeni lepra tanısı konmaktadır^(2,3).

Endemik bölgelerde devam eden bulaşmada muhtemelen subklinik enfekte bireyler en önemli rezervuarı oluşturmaktadır⁽³⁾. Bu nedenle DSÖ 2011–2015 küresel stratejisinde eliminasyon için *M. leprae* enfeksiyonunun erken tespitini, ardından etkili tedavinin hayati önemini vurgulamaktadır⁽²⁾.

Bu derleme ile Dr. Gerhard-Henrik Armauer Hansen'in *M. leprae*'yı keşfinin 150. yılı anısına lepra eliminasyon stratejileri kapsamında farkındalık yaratmak; halen dünyanın 136 ülkesinde görülen, unutulmuş ve ihmal edilen lepra hastalığı, patogenezi ve mikrobiyolojik tanısında güncel bilgilerin gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

TARİHÇE

Lepra hastaları yüzlerce yıl toplumdan dışlanmış, damgalanmış ve yargılanmışlardır. Özellikle batı toplumlarında, lepra hastalığı ilahi olarak ceza veya lanet olarak atfedilmiştir⁽⁴⁾. Norveçli bir bilim adamı olan Dr. Gerhard-Henrik Armauer Hansen, hastalığın etiyojisi ile ilgili kalıtsal ya da tanrının laneti teorisine meydan okuyarak, cüzzamın bulaşıcı bir hastalık olduğunu söylemiş ve *M. leprae*'yı keşfetmiştir⁽⁵⁾.

Lepra hastalığı tarihçesinde önemli basamaklar bulunmaktadır:

- (1) Dr. Armauer Hansen tarafından basilin keşfedilmesi, 1873, Norveç,
- (2) Dr. Guy Henry Faget tarafından tedavide sülfon ilacının kullanılması, 1941, Carville,
- (3) Dr. Charles Shepard tarafından fare ayak tabanında basilin üretilmesi, 1959, CDC, ABD
- (4) Dr. Waldemar Kirchheimer ve Dr. Eleanor Storrs tarafından dokuz bantlı armadilloya cüzzam basilinin inokülasyonu ve sonrasında bu canlıların Hansen hastalığını geliştirmeye duyarlı olduğunun gösterilmesi, 1968, Güney Körfez Araştırma Enstitüsü, Carville⁽⁴⁾.

Dr. Gerhard Henrik Armauer Hansen, Christiania Üniversitesi Tıp Fakültesinde okumuş ve Avrupa çapında cüzzam araştırmaları üzerine ana otorite olan Dr. Daniel C. Danielssen ve Dr. Carl W. Boeck ile birlikte çalışma fırsatı bulmuştur. O yıllarda Dr. Danielssen dahil birçok bilim insanı hastalığın kalıtsal geçiş teorisini savunuyordu. Temas sonrası uzun inkübasyon süresi nedeniyle hastalığın etiyojisi henüz bulaşıcılık teorisi söz konusu bile değildi⁽⁵⁾.

Norveç'te 1850'lerde yaklaşık %0.2, Bergen'de ise %2.5 kişinin cüzzamlı olduğu tahmin ediliyordu⁽⁵⁾.

Dr. Hansen, Dr. Danielssen ile birlikte Norveç genelinde cüzzamlı hastaları ziyaret ediyordu. Dr. Hansen hastalığın bulaşıcı olduğunu kanıtlamak için hastaların lezyonlarından örnek alıp inceliyordu. Bulaşma kavramının henüz yeterince anlaşılmadığı bu çağda "bulaşma teorisi"ni düşünmek ve paylaşmak aslında oldukça cesur bir yaklaşımdı. Hansen inandığı bulaşma teorisini Hocası Dr. Danielssen'le paylaştığında önemli fikir ayrılığı yaşadılar. Hastalığın bulaşma yoluyla geçişi kavramı teorisinin diğer bilim adamları tarafından da ciddi şekilde eleştirilmesine rağmen, Hansen teorisini kanıtlamak için daha fazla araştırma yapmaya çalıştı⁽⁵⁾.

Dr. Hansen, 1869'da yayınlanan ilk çalışmasında cüzzamlı dokudaki patolojik değişiklikleri tanımladı. Ancak Dr. Hansen'den yetersiz ekipman ve son derece ilkel olan bakterileri boyama tekniği ile lepra basilini yeterince etkili tanımlamasını beklemek haksızlıktı. Viyana'da 1870 yılında, boyama ve histopatoloji alanında aldığı ileri düzey eğitimle tekniğini geliştirdi. Nihayet 1873 yılında, henüz 32 yaşındayken, cüzzamlı hasta materyalindeki bulaşıcı etkeni belirleme konusundaki araştırmaları başarıyla sonuçlandı ve tarihsel çalışmasını yayınladı⁽⁵⁾.

Cüzzam hastalarının nodüllerinden alınan dokularda bakteriye benzeyen çubuk şeklindeki cisimleri tanımlamış ve bu bakterilerin cüzzamın etkeni olduğunu ve cüzzamın kalıtsal ya da cüzzamlıların günahlarının cezasını çekmesi gerektiğini söyleyen tanrının bir laneti olmadığını savundu. Aslında Dr. Hansen mikroorganizmaların insan hastalıklarına neden olabileceğini öne süren ilk araştırmacıydı. Dünya çapındaki tıp adamları bu açıklama ve onun iddialı önerisini komik buluyor ve bunun Hansen'in hayal gücünün bir ürünü olduğunu düşünüyordu. Meslektaşlarından aldığı büyük eleştirilere rağmen lepra hastalığının nedeninin mikroorganizmalar olduğunu öne süren tezinden hiç vazgeçmedi⁽⁵⁾.

Birçok bilim adamı Koch'un postülatına uygun olmadığı için Hansen'in teorisini reddetti. Hansen, Koch'un varsayımlarını yerine getirmek için çaresizce, rızası olmadan bir kadının gözüne cüzzamlı bir hastadan alınan materyali inoküle etti⁽⁵⁾. İnsanlar üzerinde deney yapmaya yönelik pervasız ve etik dışı

girişimi onu mediko-hukuki bir bataklığa sürükledi, 1880’de Dr. Hansen, insanlar üzerinde deney yaparak tıp etiğini ihlal ettiği için mahkemede suçlu bulundu ve Bergen Hastanesi’nden kovuldu⁽⁵⁾.

Robert Koch’un öğrencisi Alman bakteriyolog Albert Neisser, 1879’da hastalığı incelemek için Norveç’e gitti ve Dr. Hansen’den lepra nodüllerinden hazırladığı preparatları aldı. Almanya’ya döndüğünde kullandığı ileri boyama teknikleri sayesinde Hansen’den daha iyi sonuçlar elde etti, Dr. Hansen’den söz etmeden 1880’de bilimsel bulgusunu yayınladı, Neisser lepra neden olan organizmayı keşfetme onurunun kendine ait olduğunu iddia ediyordu⁽⁵⁾. Neisser’in intihal girişimi haberi, Norveç’e ulaştığında bilim camiası ve özellikle de Dr. Danielssen’in öğrencisi Hansen’in hakkını savundu⁽⁵⁾. Sonunda Berlin’de bir Lepra Kongresi’nde bu büyük keşif için Hansen resmi kâşif olarak ilan edildi. Hastalık etkenini keşfinden dolayı Hansen onuruna cüzzam hastalığına “Hansen Hastalığı”, cüzzam etkeni basile de “Hansen Basili” adı verildi⁽⁵⁾.

Cüzzamlıların toplumun etkilenmemiş kesiminden uzakta, ihtiyati tecritte yaşamalarına izin vermelerini emreden yasanın 1885’de kabul edilmesiyle, Hansen’in yorulmak bilmeyen çalışmasının sonucu olarak Norveç’te cüzzam hastalığı yükü hızlı ve istikrarlı bir düşüş göstermiştir⁽⁵⁾.

Epidemiyoloji

Dünyanın en eski hastalıklarından biri olan cüzzamın sömürge, ticaret, askeri istilalar, kölelik ve kitlesel göçlerle Hindistan, Çin ve Mısır’dan kıtalar arasında yayıldığı düşünülmektedir^(4,6).

DSÖ tarafından gelişmekte olan ülkelerde büyük bir tehdit olarak kabul edilen altı hastalıktan biri olarak ilan edilmiştir. Tedavi edilebilir olmasına rağmen, cüzzam genellikle geç veya yanlış tanı nedeniyle ciddi, yaşam boyu süren sakatlıklara ve deformiteye yol açar. DSÖ cüzzam eradikasyon hedefi önündeki en önemli engel hastalığın tanı ve bulaş yolları ile ilgili halen kısıtlılıkların olması ve çoklu ilaç dirençli olguların artışıdır⁽⁶⁾.

Cüzzam tropikal ülkelerde, özellikle az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelere endemiktir. 1980’lerin başında çoklu ilaç tedavisinin kullanılmaya başlanmasıyla hastalığın görülme sıklığı önemli ölçüde azalmasına rağmen özellikle Güneydoğu Asya’da, Amerika’da, Afrika’da, Pasifik’te, Batı Akdeniz’de hala yoğun olduğu ve 105 ülkede endemik olarak görüldüğü bildirilmektedir⁽⁷⁾.

Halen dünyada her yıl 120’den fazla ülkede 200.000’den fazla yeni lepra vaka bildirimi yapılmaktadır. Bir halk sağlığı sorunu olan lepranın, küresel olarak (10.000 nüfusta 1’den az yaygınlık olarak tanımlanır) ortadan kaldırılması 2000 yılından 2010 yılına kadar çoğu ülkede başarılmıştır. Brezilya, Hindistan ve Endonezya’dan 2019’da 10.000’den fazla yeni vaka bildirirken, diğer 13 ülkenin (Bangladeş, Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Etiyopya, Madagaskar, Mozambik, Myanmar, Nepal, Nijerya, Filipinler, Somali, Güney Sudan, Sri Lanka ve Birleşik Tanzania Cumhuriyeti) her biri 1000–10.000 yeni vaka bildirmiştir. Dünyada 99 ülkeden 1000’den az yeni vaka bildirimi yapılırken 45 ülkede hiç yeni vaka bildirilmemiştir⁽⁸⁾.

Türkiye’de Lepra

Türkiye’de Lepra “Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıklar” kapsamında yer almakta ve bu hastalığa yönelik “Lepra Eradikasyon Programı” uygulanmaktadır. Ülkemiz DSÖ’nün lepra eliminasyon hedefine ulaşmış olup, hastalık prevalansı 10.000’de 1 vakanın altına inmiştir. Halihazırda kayıtlı 485 lepra hastası ve 2021’de üç yeni vaka bilgisi bulunmaktadır. Hastalarının tedavi ve takipleri, Deri ve Zührevi Hastalıklar kliniklerinde yapılmaktadır. Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar DSÖ ile iş birliği içerisinde Sağlık Bakanlığı tarafından ücretsiz karşılanmaktadır^(9,10).

Türkiye’de modern anlamda Lepra savaşı 1957 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları öğretim üyelerinden Doç. Dr. Etem Utku tarafından Ankara Cüzzam Savaş Derneği’nin kurulmasıyla başlamış, daha sonra Lepra hastalarının tedavisi için kullanmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp

Fakültesi Cebeci Hastanesi kampüsü içinde yer alan Ankara Lepra Eğitim ve Araştırma Merkezi Binası yaptırılmıştır⁽¹¹⁾.

Lepranın ülkemizden eliminasyonunda; mevcut lepra hasta sayısının saptanması, mevcut hastaların kayıt altına alınarak belirlenmesi, yeni vaka oluşumunun önlenmesi için şüpheli muhitin/hasta çevresinin sıkı kontrolü, basilli hastaların takibi, inaktif hastaların takibi ve kontrolü, hastaların tıbbi tedavisi ile birlikte rehabilitasyonu, hasta ve yakın çevresinin hayat standardının yükseltilmesi aşamaları başarıyla tamamlanmıştır⁽¹¹⁾.

Türkiye'deki hasta sayısının tespiti için 1960-1970 yılları arasında Elazığ, Erzurum, Kars, Van, Ağrı ve Hakkari bölgesinden başlatılarak on yıl süren taramalar ile ülkemizdeki hasta sayısının tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaları takiben belirlenen mevcut hastalar kayıt altına alınmış, hastalar istatistiksel olarak değerlendirilerek, yaş grupları, cinsiyet ve tanıya göre ayrılmış, düzenli olarak arşiv kayıtları tutulmuştur. Bu dönemde kalifiye eleman yetiştirilmesi amacıyla kurslar, seminerler düzenlenmiştir. Prof. Dr. Türkan Saylan ve Doç. Dr. Ethem Utku, Dr. Mustafa Sütlaş, Prof. Dr. Ayşe Yüksel, Prof. Dr. Necmettin Gürhan, Prof. Dr. Ahmet Akçaboy, Prof. Dr. Atıf Taşpınar, Prof. Dr. Cengizhan Erdem, Op. Dr. Bilhan Akçaboy başta olmak üzere birçok sağlık görevlisi lepra eliminasyonunda emek harcamıştır. Prof. Dr. Türkan Saylan, herkes cüzzamlı hastalardan fersah fersah kaçarken, adeta lanetli ilan edilmiş, insan yerine konulmazken, yakınlarının bile yaklaşımdan korktuğu cüzzamlıları kucaklayıp, anne şefkati ile bağrına basarak "Onlara Dokunun" diyerek şifa dağıtmıştır. Prof. Dr. Türkan Saylan Uluslararası Lepra Birliği'nin kurucu üyeliği ve Başkan yardımcılığı görevlerini ve 2006 yılına kadar Dünya Sağlık Örgütü'nün lepra danışmanlığı görevlerini başarıyla yürütmüş, Ülkemiz ve Dünyada lepra ile mücadelelerinden dolayı 1986'da Hindistan'da "Uluslararası Gandhi Ödülü" ne layık bulunmuştur^(11,12). Ülkemizde lepraya karşı verilen mücadelenin tarihini ve bu mücadelenin simge ismi Prof. Dr. Türkan Saylan'ın hayatı ve

çalışmalarının anlatılarak, hafızalarda bu konuyla ilgili bellek yaratılması için "Türkan Saylan - Lepra Anı Evi Projesi" ve Dr. Mustafa Sütlaş'ın Cüzzam Hikayesi; "Düş Kurmadan Dünya Dönüşmez" kitabı ile cüzzamlılara adanmış hayatları ve başarıları unutulmaz kılmıştır^(13,14).

Bakteriyoloji

Mycobacterium leprae, *Schizomycetes* sınıfı, *Actinomycetales* takımı, *Mycobacteriaceae* ailesi ve *Mycobacterium* cinsinde yer alır. Mikroskobik incelemede çubuk şeklinde hareketsiz, 1.5-8 mikron uzunluğunda, 0.2-0.3 mikron eninde basillerdir. Hücre duvarının yüksek lipid içeriği nedeniyle Ziehl-Neelsen (ZN) boyama yöntemi ile aside dirençli basil (ARB) özelliği gösterir. *M. leprae*, diğer mikobakterilerden farklı olarak "globi" olarak isimlendirilen tıpkı bir paketteki sigaralar gibi çalı demetleri şeklinde paralel dizilim oluşturur. *M. leprae* Gram boyama yöntemi ile hayalet adı verilen Gram negatif görüntüler olarak veya Gram pozitif boncuk benzeri basil şeklinde görünmektedir^(7,15).

Mycobacterium leprae'nin ince yapısı mikobakteri cinsi ile ortaktır. Basilin sitoplazma, plazma zarı, hücre duvarı ve kapsül yapılarına sahip olduğu elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Sitoplazma, Gram pozitif mikroorganizmalarla ortak yapılar içerir. Plazma membranı, yüzey antijenleri ile ilişkili proteinleri içeren geçirgen bir çift katlı lipid tabakasına sahiptir. Plazma membranına bağlı hücre duvarı diğer mikobakterilere benzer şekilde peptidoglikana bağlanmış dalı zincirli polisakkaritler, mikolik asitleri destekleyen arabinogalaktan ve lipoarabinomannan'dan oluşur. Endişyapı olankapsül, lipid yapıda özellikle defitiyoseroldimikoserosat ve fenoliktrisakarit bağlı glikolipid (PGL-1) içerir. Bu trisakkarit *M. leprae*'nin spesifik antijenidir⁽⁷⁾.

Mycobacterium leprae'nin genomu 2001 yılında Cole ve ark. tarafından dizilendi ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 2.2×10^9 dalton olan dairesel genomun G+S içeriğinin %57.8 olduğu tespit edildi.

Mycobacterium leprae mikro-aerofiliktir ve ideal olarak 30-35°C arasında değişen bir sıcaklıkta ürer. Enfekte dokularda yüzlerce basil bir araya gelerek (globi olarak bilinir) kümeler oluşturur. *M. leprae*'nın henüz in vitro olarak kültürü yapılamamıştır ve jenerasyon süresi çok uzundur (14 gün)⁽⁶⁾. Kuluçka süresinin ortalama 2-5 yıl olduğu bildirilmekle beraber bu süre 10-20 yıla kadar uzayabilmektedir⁽¹⁾.

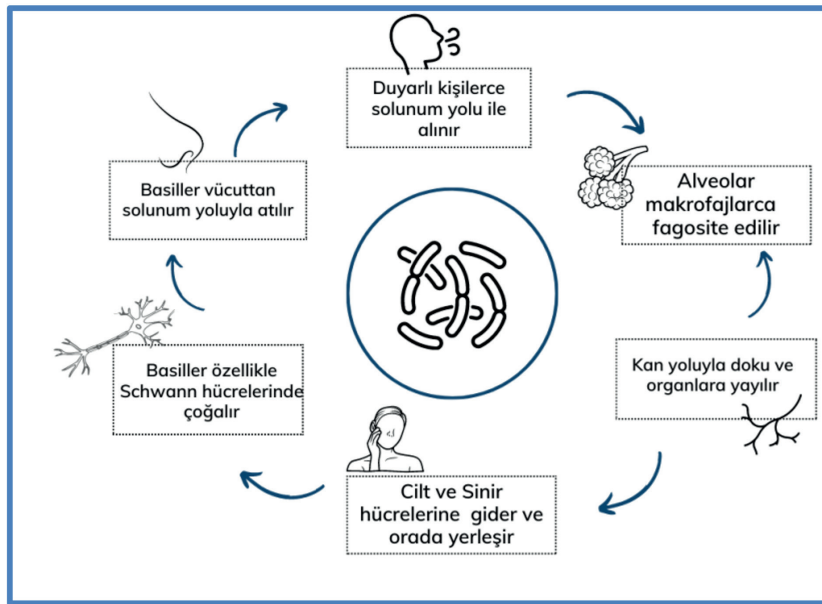
Charles C. Shepard 1960'da, Swiss albino fare ayak tabanında *M. leprae* inokülasyonu yaparak, deney hayvanı kültürü, antibiyotik tedavilerinin incelenmesi, geliştirilmesi ve antibiyotik direncinin belirlenmesini sağlamıştır⁽⁶⁾.

Kirchheimer ve Storrs⁽¹⁶⁾ 1971'de, vücut ısı 30°C ile 35°C arasında olan ve *M. leprae*'ya duyarlı dokuz bantlı armadilloları mükemmel bir hayvan modeli olarak olarak tanımlanmıştır. Bu hayvan modeli sayesinde çok yüksek miktarlarda basil üretimi 1980'lerde ve 1990'larda yürütülen birçok antijenik ve genetik çalışma için temel oldu ve sonunda 2001'de *M. leprae* genomunun dizi analizi gerçekleştirildi⁽¹⁶⁾.

Han ve ark.⁽¹⁷⁾, 2008 yılında, diffüz lepromatöz lepra ile başvuran iki hastada *M. lepromatosis* olarak bilinen yeni bir tür tespit etti. Bu yeni mikobakteri (*M. lepromatosis*) türünün tüm genom dizilim sonuçları, *M. leprae*'ya filogenetik açıdan oldukça benzediğini ve aynı atadan köken aldıklarını kanıtlandı⁽¹⁸⁾.

Mycobacterium leprae bulaşma yolları

Enfeksiyonun ana rezervuarları olarak İnsan, Afrika yeşil maymunları ve Louisiana'daki dokuz bantlı armadillolar bildirilmiştir⁽⁶⁾. Cüzzamın bulaşı, duyarlı ve genetik olarak yatkın bireyler ile tedavi edilmemiş multibasiler (MB) lepralı hastalar arasındaki uzun süreli yakın teması gerektirir. Hasta kişinin üst solunum yolu salgısında bulunan basillerin duyarlı kişiler tarafından solunması yoluyla bulaş gerçekleşir. Burun mukozası *M. leprae*'nin ana giriş veya çıkış yoludur⁽⁷⁾. Enfekte aerosollerin solunması ile *M. leprae*'nin bulaştığına dair kesin kanıtlar olduğu halde günümüzde hala bulaşma yollarının tam olarak aydınlatılmadığı, *M. leprae*'nin bulaş yollarının düşündüğümüzden çok daha karmaşık olduğu bildirilmektedir⁽¹⁹⁾.



Şekil 1. *Mycobacterium leprae* patogenezi (Çizim: Sezin Sezer Güllü tarafından yapılmıştır)

Amerika'da endemik olarak bulunan dokuz bantlı armadilloların (*Dasyus novemcinctus*) *M. leprae*'nin başka bir doğal konağı ve rezervuarı olduğu bilinmektedir. Bu durum göz önüne alındığında hem antroponotik hem de zoonotik bulaşmanın mümkün olduğu düşünülmüştür⁽¹⁹⁾.

Yapılan çalışmalar yer sincaplarının (*Ictidomystridecem lineatus*) *M. leprae* enfeksiyonuna duyarlı olduğunu göstermiştir. Son araştırmalar, İngiltere ve İskoçya'daki kızıl sincapların (*Sciurus vulgaris*) *M. lepromatosis* veya *M. leprae* ile enfekte olduğunu göstermiştir. Meredith ve ark.⁽²⁰⁾ tarafından yapılan çalışmada İskoçya'nın çeşitli yerlerinden altı kırmızı sincapta dermatit bildirmiştir. Tüm hayvanlarda iki taraflı değişken alopesi alanları ve burun bölgesi, dudaklar, göz kapakları, kulak kepçesi ve tüm uzuvların distal kısımlarında kutanöz şişlik görülmüştür. Histolojik incelemede üç sincap üzerinde çok sayıda ARB'ye ek olarak granülomatöz dermatit ve epiteloid makrofajlar gösterilmiştir. Yapılan PCR çalışmasında elde edilen hsp65 gen bölgesine ait amplikonların sekanslanması sonucu *M. lepromatosis* ile %99 sekans homolojisi olduğu ortaya çıkmıştır⁽²⁰⁾.

Çevresel rezervuarlarla ilgili araştırmalar da Lavania ve ark.⁽²¹⁾ (2006), Hindistan'daki ulusal cüzzam araştırma enstitüsü (JALMA) yakınlarındaki 15 köyden 18 toprak örneği almıştır. Bu numunelerin altısı PCR sonucunda *M. leprae* için pozitif bulunmuştur⁽²¹⁾. Mohanty ve ark.⁽²²⁾ Hindistan'da hastalara yakın cüzzam endemik bölgelerinden toprak ve su örnekleri, cüzzam bulunmadığı düşünülen alanlardan kontrol örnekleri almıştır. Cüzzamın endemik olduğu bölgeden alınan toprak örneklerinin %25.4'ü ve su örneklerinin %24.2'si *M. leprae* 16S rRNA için pozitifken, tüm kontrol örnekleri negatif bulunmuştur⁽²²⁾.

Hücre içi mikroorganizmalar ve serbest yaşayan amipler arasında bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Wheat ve ark.'nın⁽²³⁾ yaptığı çalışmada *M. leprae*'nin *Acanthamoeba echinulata*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphagave* *Hartmannella vermiformis*'te 35 gün ve amip kistlerinde sekiz aya kadar canlı kaldığı saptanmıştır⁽²³⁾.

Risk

Endemik bölgelerde yaşamak, indeks hastanın klinik sınıflandırılması, yaş, fiziksel ve genetik yakınlık başlıca risk faktörleridir. İndeks lepra hastası ile kan bağı, aynı evde yaşama ve lepra hastasının klinik sınıflandırması bulaş için en önemli risk parametreleridir. MB lepralı hastalarla temas paucibasiller (PB) lepralı hastalarla temastan daha yüksek bulaş riski taşımakta yine lezyon sayısının fazla olması da bulaş riskini artırmaktadır. Yaşlı kişilerin daha fazla risk altında olduğu saptanmıştır, 5-15 yaş ve 15-20 yaşları arasında artan bir risk olduğu, 20-29 yaşları arasında riskin azaldığı, 30 yaşından sonra riskin tekrar kademeli olarak arttığı bildirilmektedir. Bazı çalışmalarda lepranın kadınlarda daha fazla görüldüğü ifade edilmiş ve özellikle genç erişkin gebelerde hamileliğin immünolojik etkilerinin teorik olarak bu yaş grubunda daha yüksek lepra insidansına yol açabileceği düşünülmüştür. Gebe kadınların çalışma dışı bırakıldığı araştırmalarda cinsiyet farkı gözlemlenmediği bildirilmektedir⁽²⁴⁾.

Genel popülasyonda ve temaslılarda Bacille-Calmette-Guerin (BCG) aşısı uygulaması vaka kontrol çalışmaları BCG'nin *M. leprae*'ya karşı koruma sağladığını göstermiştir⁽²⁴⁾.

İmmünoloji

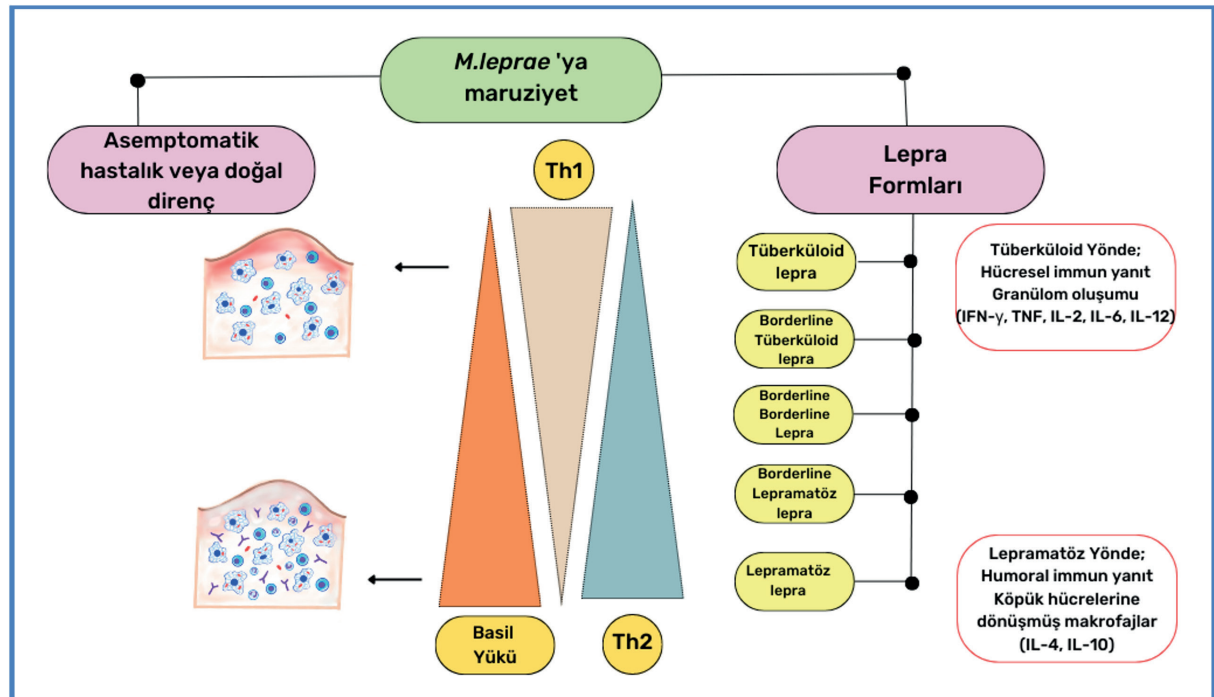
Mycobacterium leprae'ya karşı oluşan immünolojik yanıt tipleri, farklı klinik belirtilerle ilişkili bir (yelpaze) spektrum oluşmaktadır⁽²⁵⁾. Bu spektrum ilk kez Ridley ve Jopling⁽²⁶⁾ tarafından önerilen; klinik, histopatolojik, mikrobiyolojik ve immünolojik özellikleri kapsayacak şekilde tüberküloid lepra (TL), borderline (sınırdan) tüberküloid lepra (BT), borderline-borderline lepra (BB), borderline lepromatöz lepra (BL) ve lepromatöz lepra (LL) olarak sınıflandırılmıştır⁽²⁶⁻²⁸⁾. (Tablo 1)

Hücre sel yanıtın öne çıktığı tüberküloid form-PB ve humoral yanıtın baskın olduğu lepromatöz form-MB, *M. leprae* replikasyonu ile karakterizedir⁽²⁹⁾ (Tablo 1).

Tablo 1. Lepre sınıflandırmasında klinik bulgular ve bakteriyolojik indeks^(26,27)

DSÖ Sınıflandırılması (1987)	Paucibasiller (PB)		Multibasiller (MB)		
	Tek deri lezyonu	2-5 deri lezyonu	1-3+	>5 deri lezyonu	
Bakteriyolojik indeks*	0	0-1+	1-3+	3-5+	5-6+
Lepre Tipi	Tüberküloid		Borderline		Lepromatöz
Ridley&Jopling Sınıflandırılması (1966) ⁽²⁶⁾	TL	BT	BB	BL	LL
Deri Lezyonları	Kuru pullu cilt, tek infiltrate lezyon	2-5 lezyon	Çoklu makülopapüler lezyon	Çoklu makülopapüler lezyon	Cilt kalınlaşması, çoklu makülopapüler lezyonlar ve nodüller
Nörolojik Hasar	Hasar yok	Az miktarda hasar		Yavaş Simetrik Tutulum	
Bulaş		Düşük		Yüksek	
Değerlendirme	0: Alanın hiçbirinde basil yok. 1+: 100 alanda ortalama 1-10 basil. 2+: 10 alanda ortalama 1-10 basil. 3+: Her alanında ortalama 1-10 basil. 4+: Her alanında ortalama 10-100 basil. 5+: Her alanında ortalama 100-1000 basil. 6+: her alanında ortalama 1000'den fazla basil				

*İmmersiyon objektifinde (100X) 6-8 boyalı smear incelenip sayılarak hesaplanır. TL: Tüberküloid lepra, BT: Borderline tüberküloid, BB: Borderline borderline, BL: Borderline lepromatöz, LL: Lepromatöz lepra



Şekil 2. Lepre hastalığında klinik sınıflama *Mycobacterium leprae*'ya maruz kalındığında konak bağışıklık sistemi tarafından oluşturulan immün yanıt paternlerindeki farklılıklar. Lepromatöz leprada basil yükü yüksek, tüberküloid leprada basil yükü azdır. (Çizim: Sezin Sezer Güllü tarafından yapılmıştır)

Mycobacterium leprae'ya karşı konağın bağışıklık yanıtında Th1-Th2 polarizasyonunda lokal sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, immünolojik olarak aktif hormonlar, antijen dozu ve konağa giriş yolu, antijen sunucu hücrelerin uyarı türü, T hücreler ve T hücrereseptör (TCR)'ün sinyal gücü, MHC-antijen kompleksi, doğal ve edinsel immünite hücrelerinin dengesi ve karmaşık etkileşimi rol oynar^(30,31). Bunlardan en önemli yeni aktive olan T hücrelerini çevreleyen sitokin havuzudur. Polarize T hücrelerinin (Th1/Th2 yanlı) *M. leprae*'ya yanıtı çeşitli klinik belirtilerle cüzzam patogeneğinde kritik bir öneme sahiptir⁽³¹⁾.

Mycobacterium leprae'ya karşı konak bağışıklığı, Th1 tipi sitokinlerin güçlü üretimine sahip tüberküloid cüzzamdan, Th2 tipi sitokinlerin yüksek seviyeleri ve suboptimal proinflatuar yanıt ile karakterize edilen lepromatöz hastalığa kadar hastalarda görülen klinik belirtilerin çeşitliliğini belirler⁽³²⁾ (Şekil 2).

Th1 efektör hücreler IFN- γ , Th2 hücreler IL-4 üreterek immün yanıtın polarizasyonundan birincil derecede sorumlu tutulmuştur⁽³¹⁾.

Konak bağışıklık paternlerindeki farklılık, cüzzam hastalığının gelişimi ve klinik formunda belirleyicidir⁽⁶⁾.

Lepra enfeksiyonuna karşı ilk engel bütünlüğü bozulmamış epitel, epitel salgıları ve IgA'dır. Basilin yok edilmesinde doğal bağışıklık hücrelerinden aktif makrofajlar, NK hücreleri ve sitotoksik T lenfositler etkin rol alır. Dendritik hücreler tarafında virülansı düşük *M. leprae* sunumu doğal immünite ile cüzzamın klinik belirtileri gelişmeden bağışıklık yanıt oluşturabilir. Konak basille enfekte olduktan sonra, başlangıç evresinde konak immün yanıtı belirsizdir⁽⁷⁾.

Lepraya karşı gelişen son derece karışık immün yanıtta patolojik lezyonlarda T hücresi alt kümelerinin heterojenitesinin, NKT (natural killer T cells), Treg (regulator T hücre), $\gamma\delta$ T hücreleri ve yakın dönemde tanımlanan düzenleyici B hücrelerinin etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca Th1, Th17 ve Th9 benzeri hücrelerin, efektör T hücrelerinin oluşumu üzerinde düzenleyici olduğu ortaya konmuştur⁽³¹⁾.

İmmünohistokimyasal teknikler kullanılarak tüberküloid lezyonlarda ve kandaki T hücre fenotipi araştırılmış, CD4+ T hücrelerinin baskın olduğu ve CD4:CD8 oranının 2:1 olduğu tespit edilmiştir. Lepromatöz lezyonlarda ise CD8+ T lenfosit popülasyonu baskın iken kanda CD4:CD8 oranının 0.6:1 olduğu saptanmıştır. LL'de CD8+ hücrelerin çoğu CD28- fenotipindeki T-supresör hücrelerken, TL'de CD28+ T-sitotoksik hücreler hakimdir⁽⁷⁾.

T bellek fenotipinde CD4+ hücrelerinin tüberküloid granülom merkezinde CD8+ hücrelerince çevrelenmiş /sarılmış makrofajlara bağlı olduğu gözlenmiştir. Lepromatöz granülomlarda T supresör CD8+ hücreleri makrofajlar ve CD4+ hücrelerinden oluşmaktadır. Lezyonlardan yapılan T hücre klonlarının analizi ile CD4+ ve CD8+ klonları tarafından farklı sitokin paternlerinin üretildiği gösterilmiştir⁽⁷⁾.

Güçlü hücre aracılı bağışıklık ve düşük humoral bağışıklık görülen TL, ağırlıklı olarak Th1, Th17 immünolojik yanıt tarafından yönetilir. IL-2, IL-12, TNF, IFN- γ tipi sitokinlerin aktif olması sonucunda fagositik aktivite ve granülom oluşumu güçlüdür, *M. leprae*'nın çoğalmasını engeller. Serum Ig düzeyi normaldir. LL'de, Th2, Th22, Treg immünolojik yanıt ön plandadır, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sitokinleri aktif ve hipergamaglobülinemi gözlenir. Th1 yanıt yetersiz olduğu için lezyonlarda *M. leprae* çoğalması engellenemez. Lezyonlarda çok sayıda basil, zayıf granülom oluşumu gözlenmektedir^(1,33).

Humoral bağışıklık paterni ön planda olan lepromatöz formunu geliştiren bireylerde *M. leprae*'ya özgü bir hücre duvarı bileşeni fenolik glikolipid-1'e (PGL-1) karşı üretilen IgM antikorları koruma sağlamaz, basillerin çoğalması ve yayılmasına engel olamaz. LL'da hastalar genellikle çok fazla sayıda lepra basili taşıdıkları için LL'nin en bulaşıcı formudur⁽⁷⁾.

Klinik formların sınıflandırılması

Lepra Schwann hücrelerine tropizm gösteren kronik bir hastalıktır. Hastalarda ilk olarak duyuşal nevrit görülür ancak daha sonra tanı konulmasında gecikilen ve tedavi edilmemiş hastalarda daha

ciddi motor bozukluklar kendini gösterir. Lepranın asırlardır anlatılan ve şu anda görülen klinik tablosunda tanımlanan plantar ülserler, litik kemik lezyonları (burun, falanks vb.) ve felçler (unlar sinirde, lagoftalmi) sık görülen komplikasyonlar olarak adlandırılabilir⁽⁶⁾.

İndeterminate phase/belirsiz faz olarak bilinen erken dönemde çeşitli klinik belirtiler görülebilir ancak bu dönemde cüzzam hastalığını teşhis etmek zordur. Klinik, immünolojik farklılıkları olan TL'den LL'ye geniş bir spektrum gösterir. Ridley ve Jopling sınıflandırılmasına göre cüzzamın beş klinik formu tanımlanmıştır; TL, BT, BB, BL ve LL⁽⁶⁾. (Tablo 1).

DSÖ tedavi seçimini kolaylaştırmak için deri lezyonu bulunmayan / tek deri lezyonu/≤5 deri lezyonu bulunan, basil indeksi 0-1 (+) olan hastaları PB lepra, >5 deri lezyonu bulunan ve basil indeksi 1-6 (+) hastaları MB lepra olarak tanımlama ve sınıflama yapmıştır^(6,33) (Tablo 1).

TANI

Klinik bulgular

Lepra tanısında genellikle klinik değerlendirme ilk adımdır ve çoğu durumda yeterlidir. Tanıda en önemli zorluk bu hastalığın özellikle gelişmiş

ülkelerde çok nadir görülmesinden dolayı ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken hastalıklar listesinde akla gelmemesidir. Lepra tanısında seyahat veya aile öyküsünün (örneğin, endemik bir bölgeden evlat edinilmiş veya göç etmiş) alınması önemlidir. Deri lezyonları genellikle ilk klinik bulgu olarak gözlemlenmektedir. Erken dönemde tanı konulup uygun tedavi uygulanmazsa, lepra deri, sinirler, uzuvlar ve diğer organlarda kalıcı hasara neden olacak şekilde ilerleyebilir

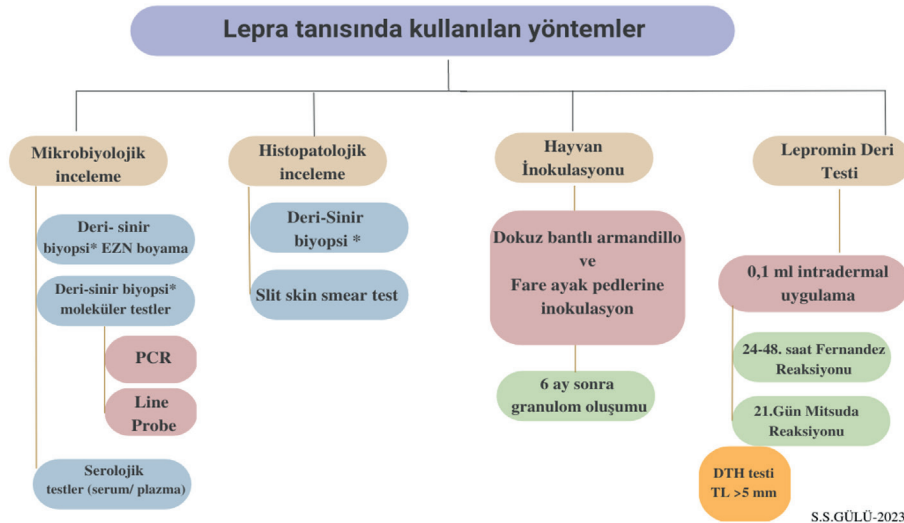
DSÖ ana tanı kriterlerini şu şekilde sıralamıştır;

- (1) Hipopigmente veya eritematöz cilt lezyonu veya kırmızimsı cilt, kesin duyu kaybı olan yama;
- (2) Kalınlaşmış veya duyu kaybı ile genişlemiş periferik sinir ve/veya sinir tarafından sağlanan kas zayıflığı; ve
- (3) Biyopsi veya deri yaymasında EZN boyalı preparatlarda gözlenen ARB pozitif basil

Her üç kriter de mevcut olduğunda, duyarlılık %95'e kadar çıkmaktadır^(8,34). Klinik tanı yanı sıra lepra tanısında mikrobiyolojik, histopatolojik, lepromin deri testi ve deney hayvanına inokülasyon gibi tanı yöntemleri kullanılmaktadır (Şekil 3).

Slit Skin SmearTesti

Slit skin smear (SSS) testi 1935'te Wade tarafından tanımlanmış, 1947'de modifiye edilmiş, derideki



Şekil 3. Lepra tanısında kullanılan yöntemler (Çizim: Sezin Sezer Güllü tarafından yapılmıştır)

küçük bir kesikten deri yayması (smear) örneği alınıp, ARB boyanarak incelenmesi prensibine dayalı bir testtir. SSS testi tecrübeli uzmanlar tarafından yapıldığında neredeyse %100 özgüllüğe sahip ve rutin yatak başı kullanımı için yeni modern tanı araçları sağlanamadığında en basit tanı tekniği olarak bildirilmektedir. SSS testi lepra tanısı, tiplerin ayırt edilmesi, hastalığın ilerlemesinin değerlendirilmesi, tedavinin etkinliğinin belirlenmesi ve hastaların takibinde kullanılmaktadır⁽³⁵⁾.

Örnek toplama için kulak memeleri ve dirsek kontralateral bölgesindeki aktif lezyonlar tercih edilmektedir. Yaralanma olmadığında hem kulak memelerinde hem de dirseklerde intradermal tıraş yapılabilir. SSS testinin özgüllüğü %100, duyarlılığı ise %50'dir⁽³⁶⁾ (Tablo 2).

Vücudun kısmen daha soğuk bölgeleri tercihen burun mukozası, kulak memesi, alın, çene, ön kolların ekstansör yüzeyleri, dizde bulunan cilt lezyonlarından toplanan örnekler Fite Faraco (FF) veya modifiye ZN boyama yöntemi ile boyanıp aside dirençli basiller araştırılır. DSÖ skalasına göre bakteriyel indeks (BI) hesaplanır (Tablo 1).

Pozitif bir sonuç, hastanın MB lepra'ya sahip olduğunu gösterir. Ancak, PB lepra durumunda negatif sonuç alınabilir, klinik şüphe durumunda moleküler yöntemler gibi daha duyarlı yöntemlerle klinik tanı desteklenir. ARB boyama tekniği ile dokuda mikroskopik olarak ARB varlığını güvenilir bir şekilde tespiti için her gr başına en az 10^4 organizma bulunması gerekmektedir⁽³⁴⁾.

Farklı lepra kliniği gösteren hastalarda kantitatif polimeraz zincir reaksiyon (qPCR) ve SSS testi yapılmış örneklerin %84'ünün qPCR'de pozitif olarak tespit edildiği, qPCR ve basil indeksi/histopatolojik pozitif bulgular arasında %87.3 uyum olduğu bildirilmektedir⁽³⁷⁾. Demsiss ve ark.⁽³⁸⁾ tarafından Etiyopya'da yapılan çalışmada klinik olarak MB lepra vakalarının %45.3'ünün SSS testi pozitif olarak belirlenmiştir⁽³⁸⁾.

Deri Biyopsisi ve Histopatolojik İnceleme

Deri biyopsisi lepra için önemli bir teşhis aracıdır. Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyası kullanılarak yapılan histopatolojik incelemede TL epitelioid granülom ve Langhans dev hücre, diffüz makrofaj infiltrasyonu LL hücreleri veya Virchow hücresi görülür.

ZN boyası ve FF, kullanılarak histopatolojik incelemede doku kesitlerinde AFB basili gösterebilir. ZN boyası kolayca bulunabildiği ve düşük maliyetli olduğu için daha yaygın kullanılmaktadır. ZN boyama ile ARB dokuda gösterilebilir ve bakteriyolojik indeks olarak ölçülebilir⁽³⁹⁾.

TL, adneks ve sinirleri çevreleyen nodüler ve histiyolenfositik infiltrasyonlarla kendini gösterir; sinirler ve ter bezlerinde infiltrasyon ve hatta destrüksiyonda gözlemlenebilir, bu da lezyonda hipoestezi veya anesteziye neden olur. Lepromatöz infiltrasyonlar histiyositik hücrelerle yoğundur. Köpüksü makrofajlar (Virchow hücreleri) ile karakterize edilir. Plazma hücreleri ve az miktarda lenfosit, iç organ ya da deri lezyonlarında bol ARB bulunur. Histopatolojik bulgular leprayı klinik tanımlamada kriter olarak kullanılır. Ridley-Jopling spektral sınıflandırmasında TL, BT, BB, BL ve LL olmak üzere beş klinik form tanımlanmıştır (Tablo 1). TL'de basil azdır, oysa LL'de Virchow hücrelerini içeren bir enflamatuvar infiltrat basil ile doludur. Deri biyopsi örneklerinin ve histopatolojik incelemenin özgüllüğü %70 ile %72 arasında değişir, ancak duyarlılık %49 ile %70 arasında değişir⁽³⁴⁾ (Tablo 3).

Deri biyopsisi incelemesinin duyarlılığında, biyopsinin örneklem büyüklüğünü temsil edecek nitelikteki uygun bölgeden alınması, ve patoloğun tecrübeli olması etkilidir⁽⁶⁾.

Lepromin Testi

Lepromin testi intradermal bir testtir. 0.1 ml lepromin antijeninin (etkisizleştirilmiş *M. leprae*) önkol fleksör

Tablo 2. Lepra tanısında kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri⁽³⁴⁾

Tanı Testleri	Duyarlılık %	Özgüllük %
Slit skin smear testi İnce kesit	50	100
Deri Biyopsi Testi	49-70	70-72
Lepromin Testi	20–25 (düşük doz)	95–100 (düşük doz)
MLSA-LAM/ MLCwATL/ BT	10–15 (yüksek doz)	60–70 (yüksek doz)
PCR	67.9-81.5	91.4-96.5
Serolojik testler ELISA (PGL-1 Antikor araştırılması)	55-71.8	86.9-93.9

MLSA-LAM: *Mycobacterium leprae* soluble antigens lipoarabinomannanMLCwA: *Mycobacterium leprae* cell wall-associated antigens**Tablo 3. DSÖ tarafından önerilen tedavi rejimi⁽³⁴⁾**

Tanı	Popülasyon	Tedavi	Doz	Süre
PB	Erişkin	Rifampisin	600 mg/ay	6 ay
		Clofazimin	300 mg/ay+50 mg/gün	6 ay
		Dapson	100 mg/gün	6 ay
	Çocuk (10-14 yaş)	Rifampisin	450 mg/ay	6 ay
		Clofazimin	150 mg/ay+50 mg/gün	6 ay
		Dapson	50 mg/gün	6 ay
	Çocuk (<10 yaş veya <40 kg)	Rifampisin	10 mg/ay	6 ay
		Clofazimin	6 mg/ay+1mg/gün	6 ay
		Dapson	2 mg/gün	6 ay
MB	Erişkin	Rifampisin	600 mg/ay	12 ay
		Clofazimin	300 mg/ay+50 mg/gün	12 ay
		Dapson	100 mg/gün	12 ay
	Çocuk (10-14 yaş)	Rifampisin	450 mg/ay	12 ay
		Clofazimin	150 mg/ay+50 mg/gün	12 ay
		Dapson	50 mg/gün	12 ay
	Çocuk (<10 yaş veya <40 kg)	Rifampisin	10 mg/ay	12 ay
		Clofazimin	6 mg/ay+1 mg/gün	12 ay
		Dapson	2 mg/gün	12 ay

yüzeyine enjeksiyonu ile geç tip aşırı duyarlılık (DTH) reaksiyonu oluşur. Oluşan erken reaksiyon 24. ve 48. saatte (Fernandez reaksiyonu), geç 21. günde (Mitsuda reaksiyonu) okunarak değerlendirilir. 5 mm'den büyük bir endurasyon basile karşı direnç varlığını gösterir, pozitif olarak okunur.

Lepromin testi (Lepromin H ve Lepromin A) aynı zamanda lepranın klinik sınıflandırılması ve prognozunu belirlenmesini de sağlar. TL/BT'li hastalarda güçlü bir DTH reaksiyonu gözlenirken BL/LL'li olgular herhangi bir cilt reaksiyonu geliştiremez.

Son zamanlarda, armadillolarda üretilen *M. leprae*'dan (glikolipid içermeyen) *M. leprae* soluble antigens lipoarabinomannan (MLSA-LAM) ve *M. leprae* cell wall-associated antigens (MLCwA) (*M. leprae* hücre duvarı ile ilişkili antijenler) olmak üzere iki yeni deri testi antijeni geliştirilmiştir. TL/ BT lepra hastalarında her iki antijenin de düşük dozlarda duyarlılığı %20 ve %25, özgüllüğü %95–100, yüksek doz antijen uygulamada, duyarlılık %10 ve %15, özgüllük %60–70 iken LL/BL lepra hastalarının anerjik olduğu bildirilmiştir⁽³⁴⁾ (Tablo 2).

PCR Testleri

Mycobacterium leprae yayılımını önlemek, süveyans, erken tanı ve tedavi için klinik örneklerdeki *M. leprae* DNA'sını saptamaya yönelik PCR gibi duyarlılığı yüksek moleküler tekniklerde kullanılmaktadır. Erken dönemde çocuklarda lepra vakalarının büyük bir kısmı cilt yaymasında ARB negatif olarak gözlenmektedir. LL veya BL tipi olan hastalarda PCR duyarlılığı yüksek (%87-100); TL/BT tipi olan hastalarda duyarlılığın düşük olduğu (%30-83) bildirilmektedir⁽³⁴⁾.

Son yıllarda moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmelerle teşhis edilmesi zor vakalarda qPCR, mikroskopik tespitten en az 20 kat daha hassas ve erken tanı için giderek daha önemli hale gelmiş; duyarlılık %78.5, özgüllük %89.3'e yükseltilmiştir. PCR rutinde çoğunlukla klinik tanıyı doğrulamak için kullanılmakta, MB lepra vakalarında duyarlılık yüksek iken PB lepra vakalarında daha düşüktür. PCR pahalı ve yoğun emek gerektiren bir yöntem olduğu için endemik bölgelerde rutin laboratuvar uygulamalarında yer alamamıştır⁽³⁴⁾.

Nepal'de yeni teşhis edilen lepra olgularının PCR ve SSS mikroskopisini karşılaştırdığı kohort araştırmada SSS tekniği ile alınan örneklerle; SSS testi ile ARB varlığı araştırılmış ve aynı örneklerden DNA izolasyonu ve PCR yapılmıştır. SSS testinin ve PCR'ın duyarlılığı sırasıyla %18 ve %72 bulunmuştur. Vaka tespitinde PCR, SSS testine göre %54 iyileştirme avantajı sağlamıştır. Ayrıca PCR, AFB negatif vakaların %66'sında cüzzam tanısını doğrulayarak SSS testine üstünlüğünü göstermiştir. PCR duyarlılığının basil

indeksi sıfır olan PB lepra hastalarında; %44, MB lepra hastalarında %78 olduğu bildirilmiştir. Nispeten maliyetli bir teknik olan PCR'ın rutin tanı için her olguda uygulanması mümkün olmasa da erken dönemde şüpheli lepra vakalarının teşhisinde sekellerin gelişiminin ve bulaşların engellenmesinde faydalı olacağı bildirilmiştir⁽⁴⁰⁾.

Serolojik Testler

ELISA ve hızlı immünokromotografik testlerde *M. leprae*'nın hücre duvarındaki spesifik antijeni PGL-1 kullanılmaktadır. Anti-PGL-1 antikorlarının belirlenmesi hastaların erken tanı ve tedavisini sağlayarak sinir hasarını azaltmaktadır. Anti-PGL-1 antikorları ayrıca tedavinin etkinliğini izlemek, bir popülasyonda lepra hastalığının yaygınlığını araştırmak için de kullanılmaktadır⁽³⁴⁾.

ELISA yöntemi ile PGL-1 antikor tespitinde duyarlılık MB vakalarda yüksek, PB lepralı hastalarda düşüktür. Duyarlılık %63.8 (%55.0–71.8), özgüllük %91.0 (%86.9–93.9) olarak bildirilmektedir⁽³⁴⁾ (Tablo 2).

TEDAVİ

DSÖ tarafından direncin önlenmesi için çoklu ilaç tedavisi rejimi önerilmiştir. Basil sayısı kriter alınarak PB ve MB formlara, erişkinlere ve çocuklarda yaşa göre tedavi şemaları oluşturulmuştur⁽³⁴⁾ (Tablo 3).

Dapsonun en önemli avantajı, enfekte bireylerin bulaştırıcılığında hızlı düşüş sağlaması ve nüks oranlarını azaltmasıdır⁽³⁴⁾.

İkinci basamak tedavi olarak minosiklin, ofloksasin ve klaritromisin de kullanılmaktadır. Lepra hastalarında ciddi sinir hasarı, kas-iskelet sistemi şekil bozuklukları olduğunda okulda ayrımcılık ve sosyal yaşamdaki zorluklar bireyleri önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle özellikle de çocuklarda erken tanı ve tedavi, bulaşmayı ve hastalık sekellerini azaltılabilir. Çocukların tablet ve kapsül şeklinde ilaç almaları zor olduğu için oral solüsyon formlara her zaman ulaşılamaması gibi sorunlar tedaviye uyumu etkilemektedir⁽³⁴⁾.

KORUNMA

Profilaktik bağışıklama; maruz kalmadan önce veya sonra profilaksi amacıyla BCGLeVax ve *Mycobacterium indicuspranii* (MIP) gibi etkinliği kanıtlanmış aşılar uygulanabilir⁽⁴¹⁾. Ancak, şu anda cüzzamdan korunmak için tek uygulanan aşı BCG dir⁽⁴²⁾. Hindistan'da, üçüncü basamak bir hastaneye başvuran MB cüzzamlı vakalar (12 yaşına kadar) ile yapılan bir çalışmada, aşılanmamış grubun oranı BCG aşıları gruba göre anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur ($p=0.0352$). Bu çalışma, BCG aşılamasının hücre aracılı bağışıklığı artırmadaki rolünü vurgulamaktadır. BCG aşısının cüzzama karşı koruma oranının %20-90 arasında olduğu tahmin edilmiştir⁽⁴³⁾.

Lepralı hastaların yetişkin ve çocuk (≥ 2 yaş) temaslılarında, koruyucu tedavi olarak tek doz rifampisin kullanılması önerilmektedir⁽⁴⁴⁾. Tek doz rifampisinin, çocukluk döneminde uygulanan BCG aşısı ile birlikte %80 kümülatif koruyucu etkinlik gösterdiği bildirilmiştir⁽⁴⁵⁾.

SONUÇ

İncil'deki sosyal imalar, toplumsal dışlanmışlık ve damgalama, teşhis ve tedavide mevcut biyopsikososyal zorluklar nedeniyle asırlık bir hastalık olan lepra, kültürel olduğu kadar tıbbi olarak da etkisini sürdürmektedir. Konak bağışıklık yanıtında Th1-Th2 polarizasyon farklılıkları hastalığın klinik olarak etkileyici derecede geniş bir spektrum oluşturmaya neden olmaktadır. Uzun inkübasyon periyodu, sinsi ilerleme, deri ve sinir tutulumunun birlikte olması, tanı ve tedavinin zamanında uygulanmasında önemli handikap yaratmaktadır. Son yıllarda geliştirilen duyarlı, hızlı tanı ve ilaç duyarlılık belirleme yöntemleri morbidite ve mortalitenin önlenmesinde başarılı olmaktadır.

Dünyanın her bölgesinden lepranın eradike edilmesi hedefine ulaşmak için; lepra bulaşının ortadan kaldırılması, endemik bölgeden gelen hipoestetik deri lezyonları ile başvuran hastalarda lepranın mutlaka hatırlanması, duyarlı, hızlı tanı tedavi yöntemlerine

erişimin sağlanması ve etkin aşı geliştirme çalışmaları desteklenmelidir.

TEŞEKKÜR

Şekillerin çizimini yapan Doktora Öğrencim Sezin Sezer Güllü'ye teşekkür ediyorum.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Margoles L, del Rio C, Franco-Paredes C. Leprosy: a modern assessment of an ancient neglected disease. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011;68(2):110-6.
2. Alberts CJ, Smith WC, Meima A, Wang L, Richardus JH. Potential effect of the World Health Organization's 2011-2015 global leprosy strategy on the prevalence of grade 2 disability: a trend analysis. *Bull World Health Organ*. 2011;89(7):487-95. <https://doi.org/10.2471/BLT.10.085662>
3. van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Batista da Silva M, et al. Evaluation of immunodiagnostic tests for leprosy in Brazil, China and Ethiopia. *Sci Rep*. 2018;8(1):17920. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36323-1>
4. Couto Dal Secco RG, França K, CastilloD, et al. A synopsis of the history of Hansen's disease. *Wien Med Wochenschr*. 2017;167(Suppl 1):27-30. <https://doi.org/10.1007/s10354-017-0590-2>
5. Ghosh S, Chaudhuri S. Chronicles of Gerhard-Henrik Armauer Hansen's life and work. *Indian J Dermatol*. 2015;60(3):219-21. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.156310>
6. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect*. 2015;45(9):383-93. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.09.002>
7. Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects. *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):205-18. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>

8. World Health Organization (WHO). Leprosy. WHO. 2023 [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leprosy] (Erişim tarihi: 01.Mart.2023).
9. T.C. Sağlık Bakanlığı. Lepra. [https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/bulasici-hastaliklar/lepra] (Erişim tarihi: Mart.2023).
10. Medimagazin. Türkiye’de 485 Lepra hastası bulunuyor. [https://medimagazin.com.tr/guncel/turkiyede-485-lepra-hastasi-bulunuyor-99116] (Erişim tarihi: Mart.2023).
11. Kundakçı N. Lepra/Cüzam hastalığı. [http://hastane.ankara.edu.tr/2021/01/25/lepra-cuzam-hastaligi/] (Erişim tarihi: Mart.2023).
12. Şahin Hamidi E. Cüzamlılara adanmış bir hayat: Türkan Saylan. Gazeteduvar. 2020. [https://www.gazeteduvar.com.tr/saglik/2020/01/25/cuzamlilara-adanmis-bir-hayat-turkan-saylan] (Erişim tarihi: Mart.2023).
13. Gümüş Akın G, Gümüş F. Türkan Saylan Lepra Anı Evi projesi. Unimuseum. 2019;2(1):21-7.
14. Köşlü A. Dr. Mustafa Sütlaş’ın cüzam hikayesi; “Düş Kurmadan Dünya Dönüşmez”. Turk J Dermatol. 2015;2:110-2.
15. Nolte FS, Metchnik B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1995:400-37.
16. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1971;39(3):693-702.
17. Han XY, Seo YH, Sizer KC, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. Am J Clin Pathol. 2008;130(6):856-64. https://doi.org/10.1309/AJPP72FJZZRRVMM
18. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, et al. In sight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genomes sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(14):4459-64. https://doi.org/10.1073/pnas.1421504112
19. Ploemacher T, Faber WR, Menke H, Rutten V, Pieters T. Reservoir and transmission routes of leprosy; A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(4):e0008276. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008276
20. Meredith A, Del Pozo J, Smith S, Milne E, Stevenson K, McLuckie J. Leprosy in red squirrels in Scotland. Vet Rec. 2014;175(11):285-6. https://doi.org/10.1136/vr.g5680
21. Lavania M, Katoch K, Sachan P, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences. J Commun Dis. 2006;38(3):269-73.
22. Mohanty PS, Naaz F, Katara D, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2016;82(1):23-7. https://doi.org/10.4103/0378-6323.168935
23. Wheat WH, Casali AL, Thomas V, et al. Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(12):e3405. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003405
24. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. J Infect Dis. 2006;193(3):346-53. https://doi.org/10.1086/499278
25. Moura RS, Penna GO, Cardoso LP, et al. Description of leprosy classification at baseline among patients enrolled at the uniform multidrug therapy clinical trial for leprosy patients in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2015;92(6):1280-4. https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0049
26. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1966;34(3):255-73.
27. Health Protection Surveillance Centre. Leprosy (Hansen’s disease) factsheet for Healthcare professionals. 2023 [https://www.hpsc.ie/az/other/leprosy/factsheets/factsheetforhealthcareprofessionals/] (Erişim tarihi: 01.Mart.2023).
28. Ruiz-Fuentes JL, Rumbaut Castillo R, Hurtado Gascón LC, Pastrana F. Leprosy in children: a Cuban experience on leprosy control. BMJ Paediatr Open. 2019;3(1):e000500. https://doi.org/10.1136/bmjpo-2019-000500
29. Rodrigues Júnior IA, Gresta LT, Noviello Mde L, Cartelle CT, Lyon S, Arantes RM. Leprosy classification methods: a comparative study in a referral center in Brazil. Int J Infect Dis. 2016;45:118-22. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.018
30. Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. Br Med Bull. 2006;77-78:103-21. https://doi.org/10.1093/bmb/ldl010
31. Sadhu S, Mitra DK. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. Front Immunol. 2018;9:604. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00604

32. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun*. 2010;78(1):293-300.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00816-09>
33. Jin SH, Ahn KJ, An S. Importance of the immune response to *Mycobacterium leprae* in the skin. *Biomed Dermatol*. 2018;2(1):1-6.
<https://doi.org/10.1186/s41702-017-0012-5>
34. Chen KH, Lin CY, Su SB, Chen KT. Leprosy: a review of epidemiology, clinical diagnosis, and management. *J Trop Med*. 2022;2022:8652062.
<https://doi.org/10.1155/2022/8652062>
35. Mahajan VK. Slit-skin smear in leprosy: lest we forget it! *Indian J Lepr*. 2013;85(4):177-83.
36. Bobosha K, Tjon Kon Fat EM, van den Eeden SJ, et al. Field-evaluation of a new lateral flow assay for detection of cellular and humoral immunity against *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5):e2845.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002845>
37. Azevedo MC, Ramuno NM, Fachin LR, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsie sand slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(1):71-8.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.017>
38. Demsiss W, Van Henten S, Takarinda KC, Kamau EM, Abdela SG. Slit-skin smear for the classification of leprosy; are we wasting time and resource? *J Infect Dev Ctries*. 2022;16(8.1):3S-7S.
<https://doi.org/10.3855/jidc.15992>
39. Roy S, Patra AC, Bandhyopadhyay D. A comparative evaluation of acid fast bacilli positivity by slit skin smears, bacterial index of granuloma in paucibacillary and multibacillary leprosy types as per WHO Operational Classification. *Indian J Lepr*. 2020;92:1-9.
40. Siwakoti S, Rai K, Bhattarai NR, Agarwal S, Khanal B. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) with slit skin smear examination (SSS) to confirm clinical diagnosis of leprosy in Eastern Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005220.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005220>
41. World Health Organization (WHO). BCG vaccine: WHO position paper, February 2018 Recommendations. *Vaccine*. 2018;36(24):3408-10.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.009>
42. Duthie MS, Saunderson P, Reed SG. The potential for vaccination in leprosy elimination: new tools for targeted interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(1):190-6.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000900027>
43. Sarkar T, Sarkar S, Patra AC, et al. BCG vaccination: effects on the patterns of pediatric leprosy. *J Family Med Prim Care*. 2020;9(7):3673-6.
https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_478_20
44. World Health Organization (WHO). Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. WHO; 2018 [<http://www.who.int/iris/handle/10665/274127>] (ErişimTarihi: 01.Mart.2023).
45. Schuring RP, Richardus JH, Pahan D, Oskam L. Protective effect of the combination BCG vaccination and rifampicin prophylaxis in leprosy prevention. *Vaccine*. 2009;27(50):7125-8.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.054>

Asemptomatik Hastalarda SARS-CoV-2 PCR Pozitiflik Oranları ve COVID-19 Aşılarının Asemptomatik Enfeksiyon Üzerindeki Etkisi

SARS-CoV-2 PCR Positivity Rates in Asymptomatic Patients and the Effect of COVID-19 Vaccines on Asymptomatic Infection

Yasemin Çakır*, Gizem Soydan Görgülü**

* Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

** Sağlık Bakanlığı Balıkesir Gönen Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Balıkesir, Türkiye

Atıf/Cite as: Çakır Y, Soydan Görgülü G. Asemptomatik hastalarda SARS-CoV-2 PCR pozitiflik oranları ve COVID-19 aşılarının asemptomatik enfeksiyon üzerindeki etkisi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):220-226.

Öz

Amaç: Coronavirus hastalığı (COVID-19) sebep olduğu mortalite ve morbidite ile dünyamızı etkilemeye devam etmektedir. Pandemi ile mücadelede semptomatik bireylerin belirlenip izole edilmesinin yanında, asemptomatik bireylerin de hastalığı yaymasını önlemek çok önemlidir. Bu çalışmanın amacı COVID-19 taraması için başvuran asemptomatik hastalardaki SARS-CoV-2 pozitiflik oranlarını belirlemek ve hastaların COVID-19 aşılanma durumlarının asemptomatik enfeksiyon ile ilişkisini belirlemektir.

Yöntem: Eylül 2021- Aralık 2021 tarihleri arasında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılan SARS-CoV-2 PCR örneklerinin sonuçları retrospektif olarak tarandı. Hastaların demografik özellikleri, semptom durumları, COVID-19 aşılanma durumları ve asemptomatik olma durumları ile aşı olma durumları arasındaki ilişki değerlendirildi.

Bulgular: SARS-CoV-2 PCR testi pozitif sonuçlanan 860 hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması 35.0±15.12 (aralık: 4-91) olup %54'ü kadın, %46'si erkek idi. Hastaların %60'ı en az bir doz aşı olurken %41'i hiç aşı olmamıştı. Hastalar en az bir doz aşı olanlar ve hiç aşı olmayanlar olarak iki gruba ayrılıp incelendiğinde aşısız grubun yaş ortalaması 29.49±16.62 yıl iken aşı grubun yaş ortalaması 38.96±16.13 yıl olup aşısız grupta yaş ortalamasının anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cinsiyet ile aşı olma durumu arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0.464$). Aşılı grupta asemptomatik pozitiflik oranı aşısız gruba göre anlamlı şekilde daha fazla (%73.2 vs %66.1) bulundu ($p=0.026$).

Sonuç: Çalışmada semptomatik pozitiflik oranı %70.2 olarak bulunmuştur ve aşılı grupta asemptomatik pozitiflik oranı aşısız gruba göre anlamlı şekilde daha fazla bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Aşı, COVID-19, SARS-CoV-2

ABSTRACT

Objective: In the fight against the pandemic, besides identifying and isolating symptomatic individuals, prevention of the spread of the disease in asymptomatic individuals is also essential. This study aimed to determine SARS-CoV-2 positivity rates in asymptomatic patients presenting for COVID-19 screening and to determine the relationship between COVID-19 vaccination status and asymptomatic infection.

Methods: The results of SARS-CoV-2 PCR samples studied in the Microbiology Laboratory of Ağrı İbrahim Çeçen University Training and Research Hospital between September 2021 and December 2021 were retrospectively scanned. The relationship between patients' demographic characteristics, symptom status, COVID-19 vaccination status, asymptomatic status, and COVID-19 vaccination status were evaluated.

Results: A total of 860 patients with positive SARS-CoV-2 PCR were included in the study. The mean age of the patients included in the study was 35.0±15.12, 54% were female and 46% were male. While 60% of the patients were vaccinated with at least one dose, 41% were not vaccinated. When the patients were divided into two groups: those vaccinated with at least one dose and those who had never been vaccinated, the mean age of the unvaccinated group was significantly lower. There was no significant difference between gender and vaccination status. The rate of asymptomatic positivity in the vaccinated group was significantly higher compared to the unvaccinated group.

Conclusion: In our study, the symptomatic positivity rate was found to be 70.2% and the asymptomatic positivity rate was significantly higher in the vaccinated group than in the unvaccinated group.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Vaccines

Alındığı tarih / Received:

23.03.2023 / 23.March.2023

Kabul tarihi / Accepted:

03.07.2023 / 03.July.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

Y. Çakır 0000-0001-5510-3216

G. Soydan Görgülü 0000-0002-5344-4516

✉ yasemincakir2553@gmail.com

GİRİŞ

31 Aralık 2019'da Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan şehrinde etiyojisi bilinmeyen pnömoni vakaları bildirilmiştir⁽¹⁾. 7 Ocak 2020'de etkenin genom dizilimi ortaya çıkarılarak, daha önce insanlarda tespit edilmemiş yeni bir coronavirus olduğu tanımlanmıştır (2019-nCoV)⁽²⁾. Daha sonra 2019-nCoV hastalığının adı Coronavirus-19 (COVID-19) olarak kabul edilmiş, virüsün Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS CoV)'ye yakın benzerliğinden dolayı da SARS-CoV-2 olarak isimlendirilmiştir. Hastalık, insandan insana bulaşma özelliği nedeniyle hızla yayılmış ve salgının başlangıcından bugüne kadar dünya çapında 600.000.000'e yakın vaka bildirilmiş ve 6.000.000'nun üzerinde ölüme neden olmuştur⁽³⁾.

COVID-19 enfeksiyonu hafif üst solunum yolu enfeksiyonu bulgularından pnömoni ve solunum yetmezliği kadar değişen klinik tablolara yol açabilmektedir⁽⁴⁾. Hastalığın en sık görülen klinik bulguları ateş, öksürük, nefes darlığı, halsizlik, miyalji gibi semptomlardır. Ancak mevcut bulgular ile COVID-19'u diğer viral solunum yolu enfeksiyonlarından kesin ayırabilen spesifik bir klinik özellik yoktur⁽⁵⁾. İnsandan insana bulaş esas olarak damlacık yolu ile olmaktadır. Ayrıca hasta bireylerin öksürme, hapşırmaya yoluyla ortaya saçtıkları damlacıklara diğer kişilerin elleri ile temas etmesi sonrasında ellerini ağız, burun veya göz mukozasına götürmesi sonucu temas ile de bulaş olmaktadır⁽⁶⁾. Yapılan çalışmalar SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş kişilerin %45'inin asemptomatik olabileceğini düşündürmektedir^(7,8). Bu durum asemptomatik kişilerin SARS-CoV-2 açısından taranması konusunu gündeme getirmiştir. Ülkemizde de bu süreçte asemptomatik bireylerin hastalığı yaymasını önlemek amacıyla belirli durumlarda SARS-CoV-2 Polymerase Chain Reaction (PCR) taraması zorunluluğu getirilmiştir. Bu çalışmada, tarama amaçlı örnek veren asemptomatik bireylerdeki SARS-CoV-2 PCR pozitiflik oranlarını ve aşılamanın asemptomatik enfeksiyon üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (25.05.2022 tarih ve 128 sayı) onaylanmıştır.

Hasta Popülasyonu: Eylül 2021- Aralık 2021 tarihleri arasında Ağrı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılan SARS-CoV-2 PCR örneklerinin sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Hastaların demografik özelliklerine laboratuvar kayıtlarından ulaşıldı. Semptomatik veya temaslı olduğu için test edilen hastalar ve daha önceden COVID-19 geçirme öyküsü olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Hastaların SARS-CoV-2 PCR sonuçlarına hastane laboratuvar sisteminden, COVID-19 aşılama durumlarına ise 'Aşıla Uygulaması'ndan ulaşıldı. Hastalar semptom durumuna göre, tamamen asemptomatik olanlar ve başlangıçta asemptomatik olup sonrasında semptom gelişenler olmak üzere iki gruba ayrıldı. 37.6°C'den yüksek ateş, baş ağrısı, boğaz ağrısı, öksürük, nefes darlığı, burun akıntısı, kas ağrısı, halsizlik veya tat ve koku duyu kaybı gibi şikayetlerden herhangi birine sahip olan hastalar semptomatik olarak değerlendirildi. PCR örneği verirken semptomatik olup olmama durumları ve sonrasındaki semptom durumları hastalar telefon ile aranarak öğrenildi. Hastalar aşılama durumuna göre aşı ve aşısız olarak iki gruba, aşı olan hastalar ise aşı durumlarına göre üç gruba ayrıldı; yetersiz aşılanmış (örnek alımından önceki 14 gün içinde herhangi bir COVID-19 aşısından yalnızca bir doz olan hastalar), kısmen aşılanmış (bir doz CoronaVac® veya Pfizer-BioNTech®, örnek alımından 14 günden daha uzun süre öncesinde veya iki doz, ikinci doz örnek alımından önceki 14 gün içinde) ve tam olarak aşılanmış (örnek alımından 14 günden daha uzun süre öncesinde iki doz CoronaVac® veya Pfizer-BioNTech® olan). Asemptomatik olup, temaslı olmayıp sadece tarama amaçlı örnek veren ve SARS CoV-2 PCR sonucu pozitif gelen tüm örneklerle test hatası açısından test tekrarı yapılmıştı.

SARS CoV-2 PCR Pozitifliğinin Saptanması: SARS-CoV-2 saptanmasında viral transport besiyeri (VTM) ya da viral nükleik asit tamponu (vNAT) içeren tüplere alınan orofarengeal ve nazofarengeal sürüntü örneklerinden, vNAT solüsyonu ile izole edilen viral RNA'lar PCR yönetimi ile amplifiye edildi. Amplifikasyon işlemi, Bio-speedy SARS-CoV-2 rRT115 PCR kitleri (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak Qiagen Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen, Almanya) ve Bio-Rad CFX 96 real time PCR (Bio-Rad Laboratories, ABD) cihazlarında yapıldı. Çalışma sürecinde SARS-CoV-2 saptaması için farklı zamanlarda *RdRp* gen bölgesini hedefleyen kit, *N* ve *ORF1ab* gen bölgesini hedefleyen çift gen çift kanallı kit ve çift gen tek kanallı kit olmak üzere üç farklı kit versiyonu kullanıldı.

İstatistiksel analiz: Verilerin analizi SPSS 26 (IBM SPSS Statistics for Windows, Ver 26.0. Armonk,NY:IBM Corp, ABD) programı ile yapıldı ve %95 güven düzeyi ile çalışıldı. Kategorik (nitel) değişkenler için frekans (n) ve yüzde (%) istatistikleri, sayısal (nicel) ölçümler için ortalama ($\bar{x}$), median (ortanca değer), standart sapma, minimum ve maksimum istatistikleri verildi. İstatistiksel anlamlılığı belirlemek için Pearson ki-kare, "Independent Sample t" ve "One-Way" ANOVA testlerinden yararlanıldı ve $p<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmanın yapıldığı tarihlerde tarama için solunum yolu örneği veren 1960 asemptomatik hastanın SARS-CoV-2 PCR sonuçları retrospektif olarak tarandı. Hastaların 860 (%43.8)'inin SARS-CoV-2 PCR testi pozitif olarak belirlendi. 860 hastanın 604 (%70.2)'ü örnek verirken ve sonrasında tamamen asemptomatikken, 256 (%29.8)'sında örnek alımı sonrasındaki süreçte semptom gelişmişti. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması 35.0 ± 15.12 yıl olup %54 (468)'ü kadın, %46 (392)'si erkek idi. Hastaların %58 (503)'i en az bir doz aşı olurken, %42 (357)'si hiç aşı olmamıştı. SARS-CoV-2 PCR sonucu pozitif olan asemptomatik hastaların COVID-19 aşılama

Tablo 1. Aşılı ve aşısız gruptaki hastaların özellikleri

	Aşılı (N=503)	Aşısız (N=357)	p
Yaş (yıl)	38.96 $\pm$ 16.13	29.49 $\pm$ 16.62	<0.001
Cinsiyet, n (%)			
Kadın	279 (55.5)	189 (52.9)	0.464
Erkek	224 (44.5)	168 (47.1)	
Semptom, n (%)			
Asemptomatik	368 (73.2)	236 (66.1)	0.026
Semptomatik	135 (26.8)	121 (33.9)	
Aşı Türü, n (%)			
Yetersiz	8 (1.6)	357 (100)	<0.001
Kısmi	118 (23.5)	0 (0.0)	
Tam	377 (74.9)	0 (0.0)	

durumları irdelendiğinde; 368 hastanın (%61) en az bir doz COVID-19 aşısı olduğu, 236 hastanın (%39) hiç aşı olmadığı saptandı. Hiç aşı olmayan asemptomatik hastaların %52'sini 18 yaş altı çocuklar oluşturmaktaydı.

Hastalar en az bir doz aşı olanlar ve hiç aşı olmayanlar olarak iki gruba ayrılıp incelendiğinde aşısız grubun yaş ortalaması 29.49 $\pm$ 16.62 yıl iken, aşılı grubun yaş ortalaması 38.96 $\pm$ 16.13 yıl olup aşısız grupta yaş ortalamasının anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cinsiyet ile aşı olma durumu arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0.464$). Aşılı grupta asemptomatik pozitiflik oranı aşısız gruba göre anlamlı şekilde daha yüksek (%73.2 vs %66.1) bulundu ($p=0.026$). Aşılı gruptaki hastalardan 8 (%1.6)'i yetersiz (tek doz vb.), 118 (%23.5)'i kısmi aşılı ve 377 (%74.9)'si ise tam aşılıydı (Tablo 1).

Yetersiz aşılınmış gruptaki hastaların yaş ortalamasının (29.77 $\pm$ 16.78 yıl), hem kısmi hem de tam aşılı gruba göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Aşı türüne göre cinsiyet oranları arasında da anlamlı bir farklılık vardı ($p=0.023$). Kısmi aşılı grupta erkeklerin oranı (%33.9) diğer gruplara göre daha düşükken, yetersiz aşılınmış grupta ve tam aşılı grupta ise kadınların oranının kısmi aşılınmış gruptaki kadın oranından (%66.1) daha düşük olduğu

Tablo 2. Aşılama türüne göre hastaların özellikleri

	Yetersiz (N=365)	Kısmi (N=118)	Tam (N=377)	p
Yaş (yıl)	29.77±16.78	36.47±16.03	39.67±16.03	<0.001
Cinsiyet, n (%)				
Kadın	191 (52.3)	78 (66.1)	199 (52.8)	0.023
Erkek	174 (47.7)	40 (33.9)	178 (47.2)	
Semptom, n (%)				
Asemptomatik	237 (64.9)	54 (45.8)	313 (83.0)	<0.001
Semptomatik	128 (35.1)	64 (54.2)	64 (17.0)	
Aşılama durumu, n (%)				
Aşılı	8 (2.2)	118 (100)	377 (100)	<0,001
Aşısız	357 (97.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	

görüldü. Tam aşılu gruptaki asemptomatik pozitiflik oranı (%83.0) diğer iki gruptan daha yüksekti. Aşılu gruptaki hastaların 8 (%2.2)'i tek doz aşılu iken, geri kalan 357 (%97.8)'sinin ise tamamen aşısız olduğu görüldü (Tablo 2).

Aşı durumunun asemptomatik olmayı etkilediği gösterildiğinden, yaştan asemptomatik olma üzerindeki etkisini incelemek için aşılu ve aşısız grup ayrı ayrı değerlendirildi. Aşısız grupta semptomatik hastaların yaş ortalaması, asemptomatik hastaların yaş ortalamasına göre daha yüksek bulundu, bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.01$) (Tablo 3).

Tablo 3. Aşı ve semptom durumunun yaş (Yıl±SS) değerlendirilmesi

	Yaş	p
Aşılı (N=503)		
Asemptomatik (n=368)	38.52±16.39	0.306
Semptomatik (n=135)	40.18±15.37	
Aşısız (N=357)		
Asemptomatik (n=236)	22.56±11.54	<0.001
Semptomatik (n=121)	43.02±16.72	

TARTIŞMA

COVID-19 pandemisinin başlangıcından bu yana biriken kanıtlar, SARS-CoV'den farklı olarak SARS-CoV-2'nin asemptomatik hastalardan da bulaştığını göstermiştir. Şubat 2020'den bu yana, SARS-CoV-2 ile enfekte olan ancak asemptomatik olan hastalar bildirilmiştir⁽⁸⁻¹⁰⁾. Araştırmalardan elde edilen kanıtlar COVID-19 enfeksiyonu geçiren bireylerin çoğunda hastalığın asemptomatik olarak seyrettiği, asemptomatik olguların daha düşük bir viral yüke sahip olmalarına rağmen, belirli bir viral yayılım süresine sahip oldukları gösterilmiştir⁽¹¹⁾. Birçok çalışmada SARS-CoV-2 ile enfekte asemptomatik bireylerin solunum yollarında semptomatik hastalarla benzer şekilde yüksek viral yük saptanabildiği⁽¹²⁻¹⁴⁾ ve asemptomatik bireylerin semptomatik bireylerle benzer bir bulaş potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir⁽¹⁵⁾.

Son epidemiyolojik, virolojik ve modelleme raporları semptomatik bireylerin dışında, asemptomatik ve presemptomatik kişilerden de SARS-CoV-2 bulaş olduğunu desteklemektedir⁽¹⁶⁾. Uçaklarda, yolcu gemilerinde, bakım evlerinde ve sosyal toplantılarda bildirilen salgınlar asemptomatik bulaşmanın önemini göstermiştir⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Sadece semptomatik COVID-19 vakalarının tanımlanması ve izolasyonunun devam eden SARS-CoV-2 yayılımını kontrol altına alamayacağını göstermek amacıyla yapılan bir modelleme çalışmasında; en yüksek bulaştırıcılığın semptomların başlangıcında olduğu, enfekte bireylerin %30'unun hiçbir zaman semptom geliştirmedeği ancak semptom geliştirenler kadar (%75 oranında) bulaştırıcı oldukları ve tüm bulaşmanın %59'unun asemptomatik bireylerden olduğu belirtilmektedir. Bu durumda bulaşların yarısından fazlasının asemptomatik bireylerden meydana geldiği tahmin edilmektedir⁽²⁰⁾.

Asemptomatik COVID-19 enfeksiyon seroprevalansının araştırıldığı birçok çalışmada asemptomatik pozitiflik oranları %33 ile %87.9 arasında değişmektedir^(8,21,22). Bizim çalışmamızda da asemptomatik enfeksiyonların, PCR ile doğrulanmış tüm SARS-CoV-2 enfeksiyonu vakalarının %70.2'sini oluşturduğu saptanmıştır. Bu durum literatürde bildirilen diğer kesitsel çalışmalarda sonuçlarla uyumludur. Ülkemizden Gülbudak ve ark.'nın⁽²²⁾ çalışmasında COVID-19 PCR testi pozitif saptanan hastalarda asemptomatik enfeksiyon oranı %33.2 olarak saptanmıştır. Ülkemizden yapılan başka bir çalışmada asemptomatik ve semptomatik COVID-19 vakalarının toraks bilgisayarlı tomografi (BT) görüntüleri incelenmiş ve asemptomatik hastalarda %72.9'luk yüksek bir oranda COVID-19 ile uyumlu BT bulgusu tespit edilmiştir⁽²³⁾.

Birçok enfeksiyon hastalığında olduğu gibi COVID-19'da da semptomatik olma durumunun yaş ile arttığı bildirilmiştir^(22,24). İtalya'da SARS-CoV-2 enfeksiyonunda semptom geliştirmedeki risk faktörlerinin değerlendirildiği bir çalışmada semptomatik olmanın yaş ile arttığı gösterilmiştir⁽²⁵⁾. Hong Kong'daki bireylerde semptomatik sonucu asemptomatik sonuçtan ayıran tek demografik faktör olarak yaş bulunmuş, yine Japon hastanesinde şiddetli vakaları hafif vakalardan ayırt ettiren faktör yaş olmuştur⁽²⁶⁾. Bizim çalışmamızda literatürle benzer şekilde semptomatik hastaların yaş ortalaması, asemptomatik hastalardan daha yüksek gözlenmiştir. Bu durumun aşı ile ilişkisini değerlendirmek için aşı

ve aşısız grup ayrı ayrı değerlendirildiğinde aşısız grupta semptom durumu ileri yaş ile ilişkiliyken, aşıli grupta semptom durumu ile yaş arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aşıli grupta yaş ortalaması daha yüksek olmasına rağmen asemptomatik oranının daha fazla görülmesi, aşılanmanın hafifletici etkisini desteklemektedir.

Pandeminin başlangıcından bu yana aşı geliştirmedeki benzeri görülmemiş küresel çaba sonucunda dünya çapında kullanım için birkaç aşı lisanslanmıştır. Bu aşılardan onaylanmasını destekleyen veriler, aşının semptomatik/ şiddetli COVID-19 hastalığını önlemesine dayanmaktadır. Klinik çalışmalardan elde edilen yayınlanmış sonuçlara göre, semptomatik COVID-19 hastalığını önlemede aşı etkinliği %70.4 ile %95 arasında değişmektedir⁽²⁷⁻²⁹⁾. Aşıların semptomatik COVID-19 enfeksiyonuna karşı etkinlik gösterdiği gösterilmişken, asemptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonu üzerindeki etkisine ilişkin sınırlı gerçek yaşam verisi bulunmaktadır ve aşının asemptomatik enfeksiyon üzerindeki etkisi büyük ölçüde bilinmemektedir⁽³⁰⁾.

İsrail'de sağlık çalışanları arasında Pfizer-BioNTech® BNT162b2 aşısı ile semptomatik ve asemptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonları arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada iki doz BNT162b2 RNA aşısı ile aşılanma hem semptomatik hem de asemptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonu için önemli ölçüde daha düşük insidans oranları ile ilişkilendirilmiştir⁽³¹⁾. Amit ve ark.'nın⁽³²⁾ sağlık çalışanlarında aşının semptomatik enfeksiyon üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada, aşısız sağlık çalışanları ile karşılaştırıldığında aşılanmışlarda SARS-CoV-2 enfeksiyonunda %85'lik bir azalma olduğu bildirilmiştir. Benenson ve ark.'nın⁽²⁵⁾ çalışmasında ise, aşısız sağlık çalışanlarına kıyasla aşıli sağlık çalışanlarında daha düşük COVID-19 insidansı bulunmuştur. Bu çalışmaların hiçbirisi asemptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyon oranlarını spesifik olarak değerlendirmemiştir. Çalışmamızla benzer şekilde bir iş yerinde COVID-19 taraması yapılan çalışanlarda BNT162b2 aşılanması sonrası asemptomatik ve semptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonları değerlendirilmiş ve aşılanmamış

çalışanlarda semptomatik pozitiflik oranları fazla iken, aşıli çalışanlarda asemptomatik pozitiflik daha fazla görülmüştür⁽³²⁾. Bizim çalışmamızda aşıli grupta asemptomatik pozitiflik oranı aşısız gruba göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bunlar içinde de tam aşıli grupta asemptomatik pozitiflik oranı, kısmi ve yetersiz aşıli gruptan daha yüksektir.

Araştırmamızın bazı kısıtlılıkları vardır. Çalışmanın tek merkezli, retrospektif bir kohort çalışması olması bulguların genellenebilirliğini sınırlayabilmektedir. Bir diğer kısıtlılık, taramaya tabi tutulan hastaların semptomatik veya COVID-19 enfeksiyonunun presemptomatik fazında olabileceğidir. Semptomatik hastalardan istenen testler bu analizin dışında tutulmuş olsa da, bazı hastalara telefon ile ulaşılamadığı için sistemde bulunan semptom durumları girilmiş olabilir veya hastalar cevaplarında dürüst davranmamış olabilirler.

Sonuç olarak çalışmamızda tarama amaçlı örnek veren ve SARS-CoV-2 PCR testi pozitif sonuçlanan hastaların büyük bir kısmının asemptomatik olduğu saptanmıştır. Hastaların aşı durumları değerlendirildiğinde ise, aşıli grupta asemptomatik pozitiflik oranının aşısız gruba göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum COVID-19 aşısının asemptomatik enfeksiyon oranlarını arttırdığını göstermiş olsa da, bu konuda büyük ölçekli ve ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (25.05.2022 tarih ve 128 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Agri Ibrahim Cecen University, Scientific Research Ethics Committee (05.25.2022; 128).

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
2. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
3. World Health Organization (WHO). Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. WHO. [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019] (Erişim tarihi: 22.Ağustos.2022).
4. Barboza JJ, Chambergo-Michilot D, Velasquez-Sotomayor M, et al. Assessment and management of asymptomatic COVID-19 infection: a systematic review. *Travel Med Infect Dis*. 2021;41:102058. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.102058>
5. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, et al. Self-reported olfactory and taste disorders in SARS-CoV-2 patients: a cross-sectional study. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):889-90. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa330>
6. Setti L, Passarini F, De Gennaro G, et al. Airborne transmission route of COVID-19: Why 2 meters/6 feet of inter-personal distance could not be enough. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(8):2932. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082932>
7. Al-Sadeq DW, Nasrallah GK. The incidence of the novel coronavirus SARS-CoV-2 among asymptomatic patients: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 2020;98:372-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.098>
8. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Ann Intern Med*. 2020;173(5):362-7. <https://doi.org/10.7326/M20-3012>
9. Byrne AW, McEvoy D, Collins AB, et al. Inferred duration of infectious period of SARS-CoV-2: rapid scoping review and analysis of available evidence for asymptomatic and symptomatic COVID-19 cases. *BMJ Open*. 2020;10(8):e039856. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-039856>
10. Poletti P, Tirani M, Cereda D, et al. Association of age with likelihood of developing symptoms and critical disease among close contacts exposed to patients with confirmed SARS-CoV-2 infection in Italy. *JAMA Netw Open*. 2021;4(3):e211085. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.1085>

11. Peker Ş, Kurnaz Ay M, Girgin Ş, Topuzoğlu A, Save D. Asemptomatik COVID-19 olgularda bulaştırıcılığın ve ilişkili faktörlerin değerlendirilmesi. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi*. 2022;7(1):162-76.
<https://doi.org/10.1001/10.35232/estudamhsd.942606>
12. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(32):2001483.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483>
13. Kimball A, Hatfield KM, Arons M, et al. Asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections in residents of a long-term care skilled nursing facility - King County, Washington, March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(13):377-381.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6913e1>
14. Ooi EE, Low JG. Asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(9):996-8.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30460-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30460-6)
15. Lee S, Kim T, Lee E, et al. Clinical course and molecular viral shedding among asymptomatic and symptomatic patients with SARS-CoV-2 Infection in a community treatment center in the Republic of Korea. *JAMA Intern Med*. 2020;180(11):1447-52.
<https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.3862>
16. Schuetz AN, Hemarajata P, Mehta N, et al. When should asymptomatic persons be tested for COVID-19? *J Clin Microbiol*. 2020;59(1):e02563-20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02563-20>
17. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(10):2000180.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180>
18. Bae SH, Shin H, Koo HY, Lee SW, Yang JM, Yon DK. Asymptomatic transmission of SARS-CoV-2 on evacuation flight. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(11):2705-8.
<https://doi.org/10.3201/eid2611.203353>
19. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med*. 2020;382(22):2081-90.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2008457>
20. Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, et al. SARS-CoV-2 transmission from people without COVID-19 symptoms. *JAMA Netw Open*. 2021;4(1):e2035057.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35057>. Erratum in: *JAMA Netw Open*. 2021;4(2):e211383.
21. Baggett TP, Keyes H, Sporn N, Gaeta JM. Prevalence of SARS-CoV-2 infection in residents of a large homeless shelter in Boston. *JAMA*. 2020;323(21):2191-2.
<https://doi.org/10.1001/jama.2020.6887>
22. Gülbudak H, Karvar Ş, Soydan G, et al. Semptomatik ve asemptomatik COVID-19 hastalarında gerçek zamanlı PCR döngü eşik değerlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2021;55(3):435-44.
<https://doi.org/10.5578/mb.20219812>
23. Demirkol EM, Kaya M, Balcı M. Asemptomatik ve semptomatik COVID-19 vakalarının BT görüntülerinin incelenmesi. *Sağlık Akademisyenleri Dergisi*. 2021;8(1):49-53.
24. Liu K, Chen Y, Lin R, Han K. Clinical features of COVID-19 in elderly patients: a comparison with young and middle-aged patients. *J Infect*. 2020;80(6):e14-8.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.005>
25. Benenson S, Oster Y, Cohen MJ, Nir-Paz R. BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine effectiveness among health care workers. *N Engl J Med*. 2021;384(18):1775-7.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc2101951>
26. Hung IF-N, Cheng VC-C, Li X, et al. SARS-CoV-2 shedding and seroconversion among passengers quarantined after disembarking a cruise ship: a case series. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(9):1051-60.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30364-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30364-9)
27. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384(5):403-16.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
28. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 2021;397(10269):99-111.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1). Erratum in: *Lancet*. 2021;397(10269):98.
29. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2603-15.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
30. Tande AJ, Pollock BD, Shah ND, et al. Impact of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccine on asymptomatic infection among patients undergoing preprocedural COVID-19 molecular screening. *Clin Infect Dis*. 2022;74(1):59-65.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciab229>
31. Angel Y, Spitzer A, Henig O, et al. Association between vaccination with BNT162b2 and incidence of symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infections among health care workers. *JAMA*. 2021;325(24):2457-65.
<https://doi.org/10.1001/jama.2021.715>
32. Amit S, Regev-Yochay G, Afek A, Kreiss Y, Leshem E. Early rate reductions of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 in BNT162b2 vaccine recipients. *Lancet*. 2021;397(10277):875-7.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00448-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00448-7)

Rekombinant Cryptostatin Proteininin ve Cryptopain 1 Sistein Proteazının Aktivitelerinin Belirlenmesi

Determination of the Activities of Recombinant Cryptostatin Protein and Cryptopain 1 Cysteine Protease

Zeynep Erdem Aynur*, Bülent Bozdoğan*,**

* Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi, Aydın, Türkiye

** Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Atf/Cite as: Erdem Aynur Z, Bozdoğan B. Rekombinant cryptostatin proteininin ve cryptopain 1 sistein proteazının aktivitelerinin belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):227-236.

Öz

Amaç: *Cryptosporidium* türlerinin neden olduğu kriptosporidiyoz, tüm dünyada oldukça yaygın olarak bulunan zoonotik bir hastalıktır. *Cryptosporidium* parazitin önemli bir virülans faktörü olan cryptopain sistein proteaz, cryptostatin ise sistein proteaz inhibitörüdür. Sistein proteazlar birçok parazitte önemli rol üstlenen virülans faktörleridir ve bundan dolayı ilaç tasarımları için belirlenen hedefler arasında yer alırlar. Bu çalışmada *Cryptosporidium parvum*'da bulunan cryptopain-1 ve cryptostatin genlerinin klonlanması ve etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: *Cryptosporidium* spp. şüpheli hayvanlardan alınan dışkılarından modifiye Kinyoun asit-fast boyaması yapılmış, etken pozitif olarak değerlendirilen örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerden cryptopain ve cryptostatin genleri klonlanmıştır. Klonlamanın ardından, total protein ekstraktı hazırlanmış ve purifiye edilmiştir. Saflaştırılan proteinler SDS-Page görüntüleme yöntemiyle değerlendirilmiştir. Saf olarak elde edilen cryptopain ve cryptostatinin, jelatinaz aktivitesi, %3 jelatin içeren besiyerinde test edilmiştir. Aynı zamanda değişik pH ve sıcaklıkta cryptopain ve cryptostatinin aktivitesi test edilmiştir.

Bulgular: Sistein proteaz olan cryptopain'de jelatinaz aktivitesi saptanırken, inhibitörü olan cryptostatin'de ve kontrol grubunda jelatinaz aktivitesi saptanmamıştır. Saflaştırılan proteinlerin IgG ve BSA degradasyonu değerlendirmelerinde ise cryptopain-1'in her iki proteini de farklı sıcaklık ve pH değerlerinde degrade ettiği tespit edilmiştir. Cryptostatinin ise değişik ısı ve pH değerlerinde cryptopain aktivitesini engellemiştir.

Sonuç: Rekombinant cryptostatinin *Cryptosporidium parvum* proteazlarının inhibisyonunda ve enfeksiyonlarında önleyici olarak kullanıma potansiyeli vardır.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium parvum*, sistein proteaz, proteaz inhibitörü

ABSTRACT

Objective: Cryptosporidiosis, caused by *Cryptosporidium* species, is a common zoonotic disease all over the world. Cryptopain, an important virulence factor of *Cryptosporidium* spp., is a cysteine protease inhibitor, and cryptostatin is a cysteine protease inhibitor. Cysteine proteases are virulence factors that play an important role in many parasites and are therefore among the targets for drug designs.

Methods: Modified Kinyoun acid-fast staining was performed using the feces of animals that may harbor *Cryptosporidium* spp., and DNA isolation was performed from the positive samples. Cryptopain-1 and cryptostatin genes were cloned. After cloning, total protein extract was prepared and purified. Purified proteins were evaluated by SDS-Page imaging. Gelatinase activity of purely obtained cryptopain and cryptostatin were tested on medium containing three percent gelatin. Moreover, the activities of cryptopain and cryptostatin at different pH and temperature were tested.

Results: Our results showed that recombinant cryptopain, a cysteine protease, had gelatinase activity, however in presence of recombinant cryptostatin and control group, no gelatinase activity was observed. In the IgG and BSA degradation evaluations of the purified proteins, it was determined that cryptopain-1 degraded both proteins at different temperatures and pH values. Cryptostatin inhibited cryptopain activity at different temperatures and pH values.

Conclusion: Recombinant cryptostatin has potential for the inhibition of *Cryptosporidium parvum* proteases and prevention of infections.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, cysteine proteases, protease inhibitors

Alındığı tarih / Received:
20.02.2023 / 20 February 2023

Kabul tarihi / Accepted:
04.07.2023 / 04 July 2023

Yayın tarihi / Publication date:
08.12.2023 / 08 December 2023

ORCID Kayıtları

Z. Erdem Aynur 0000-0003-2736-0316
B. Bozdoğan 0000-0003-2469-9728

✉ z.erdem.06@gmail.com

GİRİŞ

Clarke tarafından “fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri” olarak 1895 yılında ilk kez tanımlanan parazitler, 1907 yılında Amerikalı parazitolog Ernest Edwart Tyzzer, parazite Yunanca’da gizli spor anlamına gelen *Cryptosporidium* adını vermiştir⁽¹⁾.

Cryptosporidium ökaryotik bir protozoondur. Protozoa âleminin *Apicomplexa* şubesinde yer almaktadır. *Cryptosporidium* cinsinde bulunan tüm türlerin genetik materyalleri bir çift zarla çevrili olan nükleus içerisinde bulunmaktadır. Bu cinse mensup olan tüm türler hücre içi parazitlerdir^(2,3).

Cryptosporidium spp. hücre içi sitoplazma dışı yerleşimli gösteren protozoondur. Gastrointestinal sistemin mikrovilluslarında hasara neden olan *Cryptosporidium* insanları da kapsayan çok sayıda omurgalı türünde bulunmaktadır. Oluşturdukları tablo, konağın immun sistemine ve yaşına göre değişiklik göstermektedir. Immunsistemi baskılanmış hastalarda ve beş yaşın altındaki çocuklarda, kolera benzeri diyareye neden olabildiği için, hayatı tehdit edici bir tablo oluşturabilmektedir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) tarafından biyoterörizm ajanı olarak tanımlanan tek parazitik tür olan *Cryptosporidium* kategori B’de yer almaktadır⁽⁴⁾.

Proteazlar, peptit sindirimi, bağışıklık düzenlemesi, hücre sinyali, otofaji, farklılaşma ve hücre döngüsünün modülasyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde kritik rol oynarlar⁽⁵⁾. *Cryptosporidium* ookistlerinin, kist duvarının parçalanmasında; proteazların (aminopeptidaz, sistein proteaz ve serin proteaz) belirgin aktiviteleri tanımlanmıştır⁽⁶⁾. Kist duvarının parçalanmasında, sistein proteazların belirgin rol oynaması ve sistein proteaz inhibitörleriyle enfeksiyonun oluşmaması, proteazların *Cryptosporidium*’un yaşam döngüsünde önemli olduklarını göstermektedir⁽⁷⁾. *Cryptosporidium* cinsine ait sistein proteazlar olan cryptopainler, parazitik organizmalarda yalnızca eksistasyonda değil hücre invazyonunda ve parazit ve konak proteinlerinin modifikasyonunda ve degradasyonunda görev alırlar⁽⁸⁾.

Toplam 401 amino asitten oluşan bir sistein proteaz olan cryptopain-1, parazitin eksistasyon dışındaki sporozoid ve meront evrelerinde bulunması, konak hücre istilasında fonksiyonunun olduğu göstermektedir^(9,10). Cryptopain-1’in, konak hücrenin hücre dışı matriks unsurları olan fibronektin ve kollajeni hidrolize edebildiği de kanıtlanmıştır⁽¹¹⁾.

Cryptosporidium’da bulunan sistein proteaz inhibitörü cryptostatin olarak adlandırılmaktadır ve parazitin sistein proteazı Cryptopain-1’i inhibe eder. Cryptostatin 173 amino asitten oluşan 19.7 kDa büyüklüğünde küçük bir proteindir. Cryptostatin, cryptopain-1 dışında papain, insan katepsin-B ve katepsin L proteazlarını da inhibe edici aktivite göstermektedir⁽¹²⁾.

Çalışmamızda *Cryptosporidium*’a ait olan ve cryptopain ve cryptostatin genlerinin ekspresyon vektörlerinde klonlanması, saflaştırılması ve cryptostatinin parazitin proteaz aktivitesini önleyici potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (22.08.2017 tarih ve 082 sayı) onaylanmıştır.

Cryptosporidium prevalansının Kinyoun asit fast boyaması ve moleküler olarak değerlendirilmesi: Kinyoun asit fast boyaması sonucunda *Cryptosporidium* spp. yönünden pozitif olarak kabul edilen dışkı örneğinden DNA izolasyonu, Qiagen Stool Kit® kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir⁽¹³⁾. DNA izolasyonunun ardından *Cryptosporidium*’un moleküler tespiti için nested PCR yapılmıştır. Bunun için daha önce tasarlanan primerler kullanılmıştır (Tablo 1)⁽¹⁴⁾.

Cryptopain ve *cryptostatin* genlerinin çoğaltılması ve klonlanması: Çalışmamızda, National Center for Biotechnology Information Gen-Bank (NCBI-Gen Bankası) veri tabanı kullanılarak, araştırılacak ve

Tablo 1. *Cryptopain* ve *Cryptostatin* genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler

Primer	Primer sekansı (5'.....3')	Erişim Kodu	Referans
SSUF2	TTCTAGAGCTAATACATGCG		(14)
SSUR2	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA		(14)
SSUF3	GGAAGGGTTGTATTATTAGAT		(14)
SSUR4	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		(14)
Cryptopain F	CGTGAATTCTATGGACATAGGAAACAACG	AF091366.1	Çalışmamız
Cryptopain R	CTGCTCGAGGAAATGCTTATATTGATTG		
Cryptostatin-F	CGTGAATTCTATGAATAAGACAATTTTAGA	GU433606.1	Çalışmamız
Cryptostatin-R	CTGCTCGAGCTATTCCTTATTATTCTTC		

çoğaltılacak olan genlere ait diziler bulunmuştur (Cryptostatin, için GenBank erişim kodu GU433606.1 ve cryptopain-1 için erişim kodu AF091366). Klonlama işlemi sağlamak amacıyla bu çalışma bünyesinde tasarlanan primerlere restriksiyon kesim bölgeleri eklenmiştir (Tablo 1). Sekans doğrulamasının ardından pET28a plazmid ve ampiklonlar EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Kesim reaksiyonları 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra agaroz jelde incelenmiş ve fenol kloroform yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra, kesilmiş ampiklon ve plazmid eşit miktarlarda alınarak ligasyon için kullanılmıştır⁽¹⁵⁾. Ligasyon reaksiyon karışımı, bir saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra gece boyunca +8°C'de inkübe edilmiştir. Kimyasal kompetan hücre hazırlama yöntemi ile *Escherichia coli* BL21 hücreleri hazırlanmış ve 10 mikrolitre ligasyon reaksiyonu eklendikten sonra buz içerisinde bekletilmiş ve ısı şoku uygulanarak transformasyon sağlanmıştır. Transformasyonun ardından hücrelerin üzerine 900 µL Tryptic soy broth eklenerek 37°C'de bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından içinde 50 µg/mL kanamisin içeren seçici besi yerlerine 50 ve 200 µL olacak şekilde ekimler gerçekleştirilmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır⁽¹⁵⁾.

İnsert alan kolonilerin seçimi ve doğrulanması: Seçici besiyerinde üreyen kolonilerden onar adet seçilip spesifik primer ile koloni PCR yapılmıştır. Cryptopain-1 ve cryptostatin genleri için istenilen insert büyüklüğüne sahip kolonilerden birer tane koloni, plazmid izolasyonu için seçici besiyerine ekilmiş ve bunlardan plazmid izolasyonu yapılmıştır. İnsert restriksiyon enzimleri yardımıyla çıkarılıp

klonlama doğrulanmıştır. Plazmidlerdeki insertler sekans analizi ile de doğrulanmıştır.

Hücre lizatlarının hazırlanması: Toplam 1000 ml Luria-Bertani (LB) besiyerine *cryptopain-1* ve *cryptostatin* genlerini içeren klonların gecelik kültürden 1/20 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de OD₆₀₀'deki absorbans değeri OD 0.6-0.8 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. İndüksiyon için 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) eklenmiş ve bir gece boyunca 37°C'de çalkalanarak kültüre bırakılmıştır. Ertesi gün santrifüjle pelletler toplanmış, lizis solüsyonu [500 mM NaCl, %1 Triton X, %6 Glikoz, 20 mM NaH₂PO₄ (pH=8.0)] ile homojenize edilmiş ve sonikatör yardımıyla parçalanmıştır. Parçalama işleminden sonra lizat 5000 rpm'de 60 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant 0.45 µm'lik steril şırınga uçlu filtrelerden geçirilerek total protein kaynağı olarak kullanılmıştır⁽¹⁵⁾.

Proteinlerin Purifikasyonu: Rekombinant proteinlerin purifikasyonu immobilize metal affinite kromatografi (IMAC) yöntemi ile yapılmıştır. HisPur Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) solüsyonu prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için yıkama solüsyonu [500 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ (pH=8.0)] ve elution [500 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ ve 250 mM imidazol (pH=8.0)] solüsyonları hazırlanmıştır. Kolona Histaq uçlu proteinlerin bağlanabilmesi için, 0.1 M NiSO₄ yüklenmiş, yıkama solüsyonu ile dengeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Dengeleme işleminin ardından lizis solüsyonu içerisinde bulunan total protein kaynağı kolona yüklenmiştir. Yıkama solüsyonu

ile kolona tutunmayan proteinlerin giderilmesi sağlanmıştır. Kolona bağlanan proteinler elüsyon solüsyonu ile toplanmıştır⁽¹⁶⁾.

SDS Page işlemi: Rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiş ve saflaştırılmış olan cryptopain; 45.47 kDa ve cryptostatin; 19.79 kDa ağırlığa sahip olduğu için %15'lik separasyon jeli hazırlanmıştır. Jel hazırlandıktan sonra, saflaştırılmış olan enzimler iki ayrı 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne, 15'er µl eklenmiş ve üzerlerine 15'er µl sample buffer konulmuştur. Hazırlanan karışım, 100°C'deki ısı bloğunda 5-10 dakika denatüre edilip spin yapılarak buharı toplanmıştır. Hazırlanan jel dikey elektroforez cihazına yerleştirildikten sonra camların üst çizgisine gelecek ve tanktaki elektroforez tellerini geçecek şekilde 250 mL yürütme tamponu ilave edilmiştir. Tampon ilave edildikten sonra, hazırlanan yaklaşık 30 µl karışım ve marker'lar pipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Enerji kaynağıyla bağlantısı yapılan tankın elektrik düzeyleri 110 V'da boya en alt çizgiye gelene kadar elektroforez işlemi (iki saat) gerçekleştirilmiştir. Jelde yürüyen proteinleri görüntülemek için, jel dikkatlice boyama yapılacak küvete alınmış sonra su ile jel yıkanmıştır. Jeli boyamak için, commasie blue boyası kullanılmıştır. Commasie blue boyası jeli kapatacak şekilde kap içerisindeki jel üzerine dökülmüş, kabın kapağı yarım kapatılarak bir dakika mikrodalga fırında yüksek derecede ısıya tabi tutulmuştur. Daha sonra 15-20 dakika çalkalayıcı üzerinde yavaşça inkübe edilmiştir. Boya geri toplanıp ve destain solüsyonu jelin üstüne dökülmüştür ve mikrodalgada bir dakika ısıtılıp sonra 20-30 dakika karıştırıcıda yavaşça inkübe edilmiştir. Bu son işlem bantlar net görünene kadar tekrar edilmiştir.

Jelatinaz aktivitesinin test edilmesi: Sistein proteaz enzimlerinin substratları arasında jelatin, kollajen, fibronektin gibi hücre dışı matriks elemanları bulunmaktadır. Çalışmamızda rekombinant olarak ürettiğimiz sistein proteaz cryptopain ve sistein proteaz inhibitörü cryptostatinin işlevsel olup olmadığının belirlenmesi için jelatinaz aktivitesi değerlendirilmiştir. Jelatinaz deneyi, jelatin (30 g/L) içeren LB içerisinde gerçekleştirilmiştir. Seçici besiyerinde ayrı ayrı üretilen cryptopain, cryptostatin ve kontrol amaçlı olarak kullanılacak olan pET28a plazmidi içeren BL21 suşu gecelik kültüre bırakılmıştır.

Gecelik kültürler, jelatin içeren besi yerine inoküle edilmiş, 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılmış, ardından 4°C'de beş saat boyunca tutulmuştur. Yarı katı halde görülen kültürler jelatinaz aktivitesi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir⁽¹⁷⁾.

Proteaz aktivitesinin ve enzim stabilitesinin test edilmesi: Farklı pH ve sıcaklıklardaki enzim stabilitesinin değerlendirilmesi için, cryptopain ve cryptostatin enzimlerinin aktivitesi, farklı pH (5.0-6.5 ve 8.0) ve sıcaklık değerlerinde (37°C, 56°C ve 95°C) ölçülmüştür.

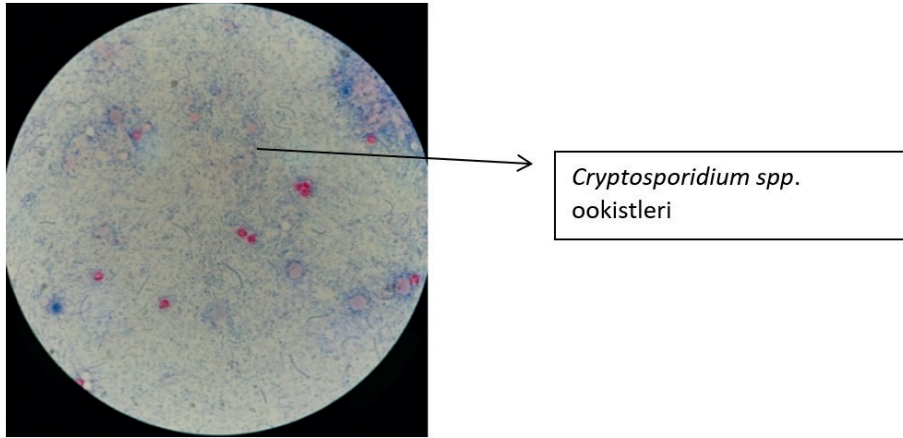
Bu amaç için pH değerleri 5.0 (sodyum asetat), 6.5 (sodyum fosfat) ve 8.0 (Tris-HCl) olan tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Saflaştırılan ürünler, bu tampon solüsyonları içerisinde 37°C sıcaklıkta üç saat inkübe edilmiştir. Sıcaklığa bağlı enzim stabilitesinin ölçümü için, saflaştırılan ürünler 37°C, 56°C ve 95°C'lik termal bloklarda 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Sıcaklık ve pH muamelesinin ardından, saflaştırılan cryptopain proteininin proteaz aktivitesinin ölçülmesi için, cryptopain ve BSA, cryptopain ve IgG ayrı ayrı eşit miktarlarda (200 µg/ml) karıştırılarak, 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar %12.5'lük SDS-Page jeli ile değerlendirilmiştir. Cryptostatinin enzim aktivitesinin test edilmesi için, cryptopain ve cryptostatin eşit oranlarda karıştırılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Enzim/inhibitör karışımı, BSA (200 µg/ml) üzerine eklenerek, 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve sonuçlar SDS-Page ile değerlendirilmiştir.

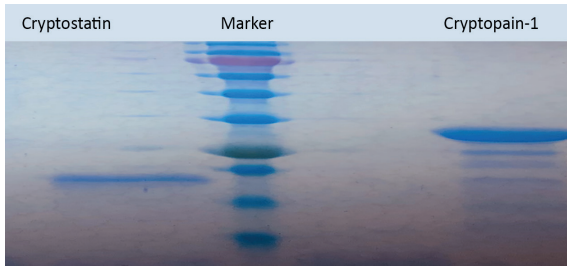
BULGULAR

Kinyoun Asit Fast Boyaması ile Ookist Varlığının Gösterilmesi: Kinyoun asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium*'a ait olduğu düşünülen mikroskop görüntüleri elde edilmiştir (Resim 1).

Cryptopain ve Cryptostatin geninin klonlanması ve üretimi: Koloni PCR ve restriksiyon analizleri ile konfirmasyonu sağlanmış olan genlere ait birer adet ampikon doğrulama amacıyla ticari bir firmaya sekans



Resim 1. Kinyoun Asit Fast boyaması sonucu pozitif olarak değerlendirilen örneğe ait mikroskop görüntüsü. Kinyoun Asit Fast boyaması sonucunda mavi zemin üzerinde pembe ookistlerin görülmesi dışkıda *Cryptosporidium* olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir.



Resim 2. Cryptostatin ve cryptopain genlerinin SDS-PAGE görüntüsü. Ticari olarak satın alınan GenColor Prestained Protein Marker'da yeşil ile boyanan bant 25 kDa, kırmızı ile boyanan bant 75 kDa boyutunu vermektedir. 19.7 kDa boyutundaki Cryptostatin 25 kDa'luk bantın altında, 45 kDa boyutundaki Cryptopain ise kırmızı ile yeşil bantın arasında yer almaktadır.

analizi için gönderilmiştir. Sekans değerlendirmesi sonucunda *cryptopain-1* geni %99, *cryptostatin* geni %95 benzer bulunmuştur. Saflaştırılan rekombinant proteinlerden cryptostatine ait 19 kDa ve cryptopaine ait 45 kDa boyutundaki bant SDS-Page analizi ile doğrulanmıştır (Resim 2).

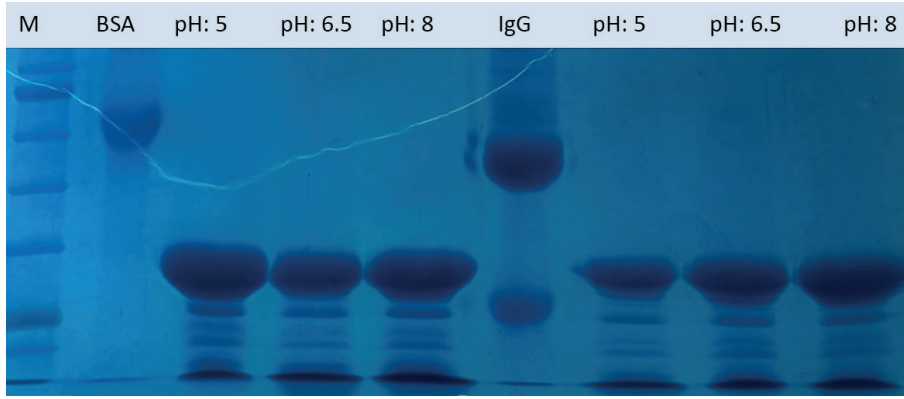
Jelatinaz aktivitesi: Jelatinaz aktivitesi değerlendirme sonuçlarına göre sistein proteaz olan cryptopainde jelatinaz aktivitesi saptanırken, sistein proteaz inhibitörü olan cryptostatin ve kontrol olarak kullanılan pET28a içeren BL21 örneğinde jelatinaz aktivitesi saptanmamıştır (Resim 3).

Proteaz aktivitesinin test edilmesi: Çalışmada toplam üç farklı pH değeri (5, 6.5 ve 8) denenmiş, proteaz aktivitesinin pH değişimlerinden etkilenmediği

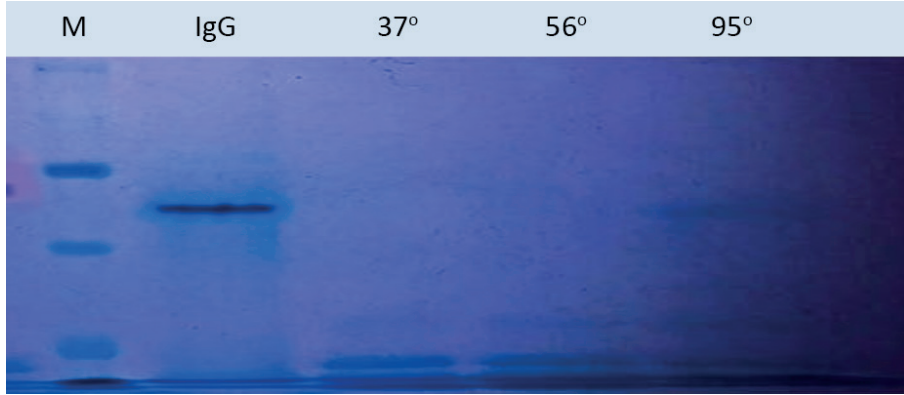


Resim 3. Üretilen rekombinant proteinlerin ve pET28a içeren BL21'in jelatinaz aktivitesi. Pet ve cryptostatin yazılı olan falkonlarda jelatinaz aktivitesi görülmemiş olup, katılaşma meydana gelmiştir. Cryptopain yazılı olan falkonda ise jelatinaz aktivitesi gerçekleşmiş olup, yüzde üç jelatin içeren besi yeri akışkan hale gelmiştir.

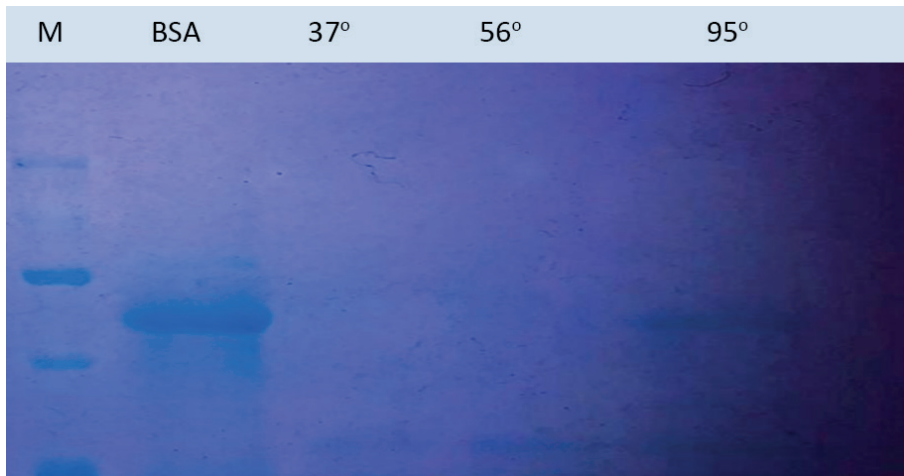
gözlenmiştir (Resim 4). Toplamda üç farklı sıcaklık değeri (37, 56 ve 95°C) denenmiş ve rekombinant cryptopain aktivitesinde 37°C ve 56°C'de herhangi bir değişiklik görülmezken, 95°C'de aktivitede bir miktar (ImageJ programı (<https://imagej.net/ij/docs/index.html>) ile absorbands ölçümleri sonucunda %20) azalma görülmüştür (Resim 5, Resim 6). Rekombinant cryptostatin aktivitesinde ise sıcaklık değişimi sonucunda bir değişiklik gözlenmemiştir (Resim 7).



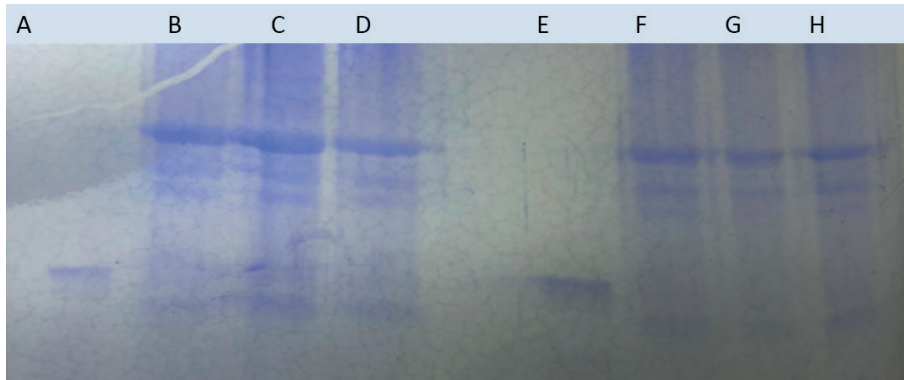
Resim 4. Rekombinant Cryptopain 1'in değişik pH bufferlarında inkübasyonu sonucunda BSA ve IgG üzerinde ki etkisi. BSA ve IgG ile belirtilen sütunlarda proteinlerin cryptopain-1 ile muamele edilmeden önceki halleri yer almaktadır. Bu sütunlarda her iki proteininde ortalama boyutu 75 kDa olarak görülürken, değişik pH bufferları (pH 5, 6.5 ve 8) ile muamele edilmiş cryptopain ile inkübasyona bırakıldıklarında proteinlerin boyutlarında azalmalar meydana gelmiştir.



Resim 5. Rekombinant Cryptopain 1'in değişik sıcaklıklarda inkübasyonu sonucunda IgG üzerinde ki etkisi. IgG ile belirtilen sütunda proteinlerin cryptopain-1 ile muamele edilmeden önceki hali yer almaktadır. 37°C'de ve 56°C'de önceden muameleye bırakılan enzimin aktivitesinde herhangi bir kayıp görülmezken, enzim kaynatma sıcaklığında inkübasyona bırakıldığında aktivitesinde azalma (%20 oranında) meydana gelmiş ancak aktivitesini sürdürmüştür.



Resim 6. Rekombinant Cryptopain 1'in değişik sıcaklıklarda inkübasyonu sonucunda BSA üzerinde ki etkisi. BSA ile belirtilen sütunda proteinlerin cryptopain-1 ile muamele edilmeden önceki hali yer almaktadır. 37°C'de ve 56°C'de önceden muameleye bırakılan enzimin aktivitesinde herhangi bir kayıp görülmezken, enzim kaynatma sıcaklığında inkübasyona bırakıldığında aktivitesinde azalma (%20 oranında) meydana gelmiş ancak aktivitesini sürdürmüştür.



Resim 7. Rekombinant Cryptostatin'ın değişik sıcaklıklar ve pH değerlerinde Cryptopain aktivitesini inhibe etme özelliği. A: CP (pH=6.5)+BSA; B: CP (pH=6.5)+BSA+CS (pH=5.0); C: CP (pH=6.5)+BSA+CS (pH=6.5); D: CP (pH=6.5)+BSA+CS (pH=8.0); E: CP (37°C)+BSA; F: CP (37°C)+BSA+CS (37°C); G: CP (37°C)+BSA+CS (56°C) H: CP (37°C)+BSA+CS (95°C)

TARTIŞMA

Cryptosporidium tanısının konulmasında çoklaştırmaya işleminin ardından yapılan modifiye boyama yöntemleri altın standart olarak kabul edilmektedir. PCR tekniği, *Cryptosporidium* türlerinin klinik olgulardan ve çevresel kaynaklardan izole edilmesi amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır⁽¹⁸⁾. Bu teknikte, örneklerde bulunan bir ookist bile saptanabilmektedir⁽¹⁹⁾. *Cryptosporidium* tanılmasında kullanılan en duyarlı yöntemin, 18S rRNA temelli nested-PCR olduğu bildirilmiştir⁽²⁰⁾.

Cryptosporidium spp.'in sığırlardaki prevalansı Türkiye'de ve dünyada %3.8-96 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır^(21,22). Dünya genelinde sığırlarda *Cryptosporidium* varlığına yönelik çalışmalar baz alındığında en yüksek prevalans Avrupa'da (%30.7) görülürken en düşük prevalans Afrika ülkelerinde (%13.2) görülmektedir. Enfeksiyonun yaygınlık oranı; Asya'da %17.0, Kuzey Amerika'da %21.7, Güney Amerika'da %25.6 ve Okyanusya'da %22.6 olarak belirlenmiştir⁽²³⁾.

Proteazlar, peptit bağlarının hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Peptitlerin sindirimi, diğer enzimlerin aktivasyonu, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, hücre farklılaşması ve otofajiyi sağlamaktadır⁽⁵⁾. Parazitik organizmalarda bulunan sistein proteazlar, hücre/doku penetrasyonu, konak veya parazit proteinlerinin hidrolizi, otofaji ve konak

immün sisteminden kaçma veya immün sistemin modülasyonu sağlarlar. Bu nedenle, protozoan parazitlerin patogeneğinde kilit rol oynar ve onlara karşı kemoterapötik ilaç ve aşı hedefleri haline gelirler⁽⁵⁾.

Cryptosporidium parvum genomunda cryptopaini kodlayan beş gen (cathepsin L-benzeri proteazlar, CA klanının bir temsilcisi) tanımlanmıştır. Bugüne kadar yalnızca cryptopain-1'in biyokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir⁽⁹⁾. Cryptopain-1, parazitin bulaşıcı aşaması olan sporozoitlerde aktif olarak kopyalanır ve ifade edilir⁽⁹⁾. Cryptopain-1, 1206 bp'lik bir diziden oluşan 401 amino asit tarafından kodlanan bir proteazdır. Cryptopain-1'in biyolojik rolü tam olarak bilinmemekle beraber muhtemel rolünün tespiti için immunofloresans analizleri yapılmaktadır. Cryptopain-1, konak hücre dışı matriks unsurları olan, fibronektin ve kollajeni hidrolize ettiği western blot analizi ile saptanmıştır. Konak hücre dışı matriks unsurlarını hidrolize edebilmesi, bu enzimin; konak hücre işgali sırasında önemli bir enzim olabileceğini düşündürmektedir⁽¹²⁾.

Proteazlar, tüm organizmalarda, biyolojik süreçlerinin çeşitli evrelerinde önemli roller oynamaktadırlar. Proteaz aktivitesi, çeşitli seviyelerde düzenlenmektedir. Aktivite, gen ekspresyonunun düzenlenmesinden, spesifik inhibitörlerin sentezine kadar uzanan aşamalarda düzenlenebilmektedir. *Cryptosporidium*'da bulunan

sistein proteaz olan *Cryptopain-1*'in, proteaz aktivitesi spesifik inhibitörü olan *cryptostatin* tarafından düzenlenmektedir. *Cryptostatin*, 537bp uzunluğunda ve 19.7 kDa büyüklüğünde 173 amino asit tarafından kodlanan küçük bir moleküldür. *Cryptostatin* *Cryptosporidium*'un hayat döngüsünde meront ve ookist evrelerinde görülmekte, hücre içi organellerde ya da membranlarda tam bir lokalizasyon olmadan dağılmış halde bulunmaktadır⁽¹⁴⁾. *Cryptostatin*; *Cryptopain-1* inhibe ettiği gibi, *papain*, insan katepsin B'ye ve insan katepsin L'ye karşıda inhibe edici aktivite göstermektedir⁽¹⁴⁾.

Cryptopain-1, en iyi pH 6.5'te aktivite gösterirken, geniş bir pH aralığında da (pH 5.5-7.0) aktivitesini kaybetmemektedir. Nötr pH'larda nispeten daha kararlı olan enzim, asidik koşullarda nispeten kararsız hale gelebilmektedir⁽²⁴⁾. Tüm chagasin ailesi sistein proteazları ve inhibitörleri gibi *cryptopain* ve *cryptostatine*, kaynatma sonrasında bile özelliklerini koruyabilmektedir⁽²⁴⁾. Çalışmamızda, maksimum proteaz ve proteaz inhibitörünün aktivitesi pH 6.5'te olurken, diğer pH değerlerinde de önemli bir aktivite kaybı gözlenmemiştir. Yine maksimum proteaz ve proteaz inhibitörünün aktivitesi 37°C'de görülürken, elde edilen rekombinant ürün 56°C ve 95°C'de de aktivitesini sürdürmüştür. Üründe termal ve pH stabilitesinin olması enzimin saha koşullarında yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Sistein proteazlar, dokunun yapısal proteinleri olan laminin, kollajen, fibronektin yapısal bütünlüğünü bozabilmektedirler. Sistein proteazların bu özelliklerinden dolayı debridman olarak kullanılma potansiyelleri de mevcuttur. Çalışmamızda rekombinant olarak üretilen, *Cryptopain-1*'in jelatin parçalaması elde edilen ürünün debridman olarak kullanılma potansiyelini göstermektedir.

Parazitlere ait olan sistein proteazların, rekombinant üretimi ve etkilerinin değerlendirilmesi çalışmaları oldukça azdır. Yapılan çalışmalar, bu enzimlerin biyokimyasal yapısı ve özellikleri üzerinedir. Bu çalışmalarda, bu enzimlerin olası kemoterapötik ajanlar olabileceği hususuna değinilmiştir.

Cryptosporidium parvum'un spesifik bir tedavisi ve onaylanmış ticari bir aşısı bulunmamaktadır. Hastalığın tedavisinde kullanılabilecek tam etkin bir ilaç yoktur⁽²⁵⁾. Sistein proteazlar parazitik organizmalar için aşı olabileme potansiyeline sahiptir. Sistein proteaz inhibitörleri de söz konusu bu organizmalar için etkili kemoterapik ajanlar olarak ön plana çıkmaktadır. Branquinho ve ark.'nın⁽²⁶⁾ 2013 yılında ve Chavez-Fumagalli ve ark.'nın⁽²⁷⁾ 2017 yılında yaptıkları çalışmalarda *Leishmania* türlerinde bulunan kalsiyum bağımlı sistein proteaz türevi calpainin insanda *Leishmania* türlerine karşı potansiyel ilaç ve aşı hedefi olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ndao ve ark.⁽²⁸⁾ 2013 yılında yaptıkları çalışmada; sentetik *cryptopain* inhibitörü olan N-methyl piperazine-Phe-homoPhe-vinylsulfone phenyl (K11777) fare modellerinde kullanmış ve kriptosporidioze karşı potansiyel ilaç olma potansiyelini araştırmışlardır. K11777 in vivo ve in vitro ortamlarda herhangi bir toksik etki göstermemiş, buna ek olarak ookist sayısında belirgin bir azalma sağlanmıştır. Rekombinant olarak üretimini gerçekleştirdiğimiz *Cryptopain-1*'in aşı, *Cryptostatin*'in ise enfeksiyonun tedavisinde kullanılma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (22.08.2017 tarih ve 082 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Adnan Menderes University, Animal Research Local Ethics Committee (08.21.2017; 082).

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Tyzzer EE. *Cryptosporidium parvum* (Sp. Nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protist. 1912;26:394-412.
2. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microb Rev. 2004;17(1):72-97. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.1.72-97.2004>
3. Fayer R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: General Biology. Fayer R, Xiao L, Boca Raton, editors. CRC Press; 2008:1-41.
4. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Emergency Preparedness and Response. Atlanta, 1946. [<https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#b>] (Erişim Tarihi: Ocak.2023).
5. Siqueira-Neto L, Debnath A, McCall LI, et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(8):e0006512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
6. Forney JR, Yang S, Healey MC. Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Parasitol. 1996;82:889-92. <https://doi.org/10.2307/3284194>
7. Okhuysen PC, Chappell CL. *Cryptosporidium* virulence determinants - are we there yet? Int J Parasitol. 2002;32(5):517-25. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00356-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00356-3)
8. McKerrow JH, Rosenthal PJ, Swenerton R, Doyle P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. Curr Opin Infect Dis. 2008;21(6):668-72. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328315cca9>
9. Na BK, Kang JM, Cheun HI, et al. Cryptopain-1, a cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*, does not require the pro-domain for folding. Parasitology. 2009;136(2):149-57. <https://doi.org/10.1017/S0031182008005350>
10. Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. Microbios. 1995;83(335):77-88.
11. Na BK, Kang JM and Sohn WM. CsCF-6, a novel cathepsin F-like cysteine protease for nutrient uptake of *Clonorchis sinensis*. Int J Parasitol. 2008;38(5):493-502. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.001>
12. Kang JM, Ju HL, Yu JR, Sohn WM, Na BK. Cryptostatin, a chagasin-family cysteine protease inhibitor of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology. 2012;139(8):1029-37. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000297>
13. Ash LR, Orihel TC. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. Chicago (IL): American Society of Clinical Pathologists Press, USA; 1987.
14. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol. 1999;65(4):1578-83. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999>
15. Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA; 2012.
16. Bio-Rad Laboratories, Inc. California, 1952. [<https://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/affinity-purification-tagged-recombinant-proteins?ID=LUSMKU2B7>] (Erişim Tarihi: Ocak.2023).
17. Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. J Microbiol Methods. 2001;47(1):11-6. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00283-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00283-4)
18. Morgan U, Weber R, Xiao L, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. J Clin Microbiol. 2000;38(3):1180-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1180-1183.2000>
19. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):554-63. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.554>
20. Pedraza Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst Wall protein gene. Emerg Inf Dis. 2001;7(1):49-56. <https://doi.org/10.3201/eid0701.700049>
21. Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. Vet Parasitol. 2006;141(1-2):48-59. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.032>
22. Gündüz N, Arslan MÖ. Kars yöresinde buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları prevalansinin asit fast boyama (mAF) ve ELISA yöntemleriyle belirlenmesi. Türkiye Parazit Derg. 2017;41(1):5-8. <https://doi.org/10.5152/tpd.2017.4833>
23. Chen Y, Huang J, Qin H, Wang L, Li J, Zhang L. *Cryptosporidium parvum* and gp60 genotype prevalence in dairy calves worldwide: a systematic review and meta-analysis. Acta Trop. 2023;240:106843. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106843>

24. Rigden DJ, Mosolov VV, Galperin MY. Sequence conservation in the chagasin family suggests a common trend in cysteine proteinase binding by unrelated protein inhibitors. *Protein Sci.* 2002;11(8):1971-7. <https://doi.org/10.1110/ps.0207202>
25. Zhu G, Fritzler JM. Novel anti-*Cryptosporidium* activity of known drugs identified by high-throughput screening against parasite fatty acyl-CoA binding protein (ACBP). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(3):609-17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr516>
26. Branquinha MH, Marinho FA, Sengenito LS, et al. Calpains: Potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids. *Curr Med Chem.* 2013;20(25):3174-85. <https://doi.org/10.2174/0929867311320250010>
27. Chavez-Fumagalli MA, Schneider MS, Lage DP, Machado-de- Avila RA, Coelho EAF. An in silico functional annotation and screening of potential drug targets derived from *Leishmania* spp. hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Exp Parasitol.* 2017;176:66-74. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.03.005>
28. Ndao M, Nath-Chowdhury M, Sajid M, et al. A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6063-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.00734-13>

2018-2021 Yılları Arasında Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi'nde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilerin Tür Dağılımı ve Gram Negatif Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları

Species Distribution of Bacteria Isolated From Blood Cultures and Antibiotic Susceptibilities of Gram Negative Bacteria in Prof. Dr. Süleyman Yalçın City Hospital Between 2018-2021

Şule Çetin*, Tuncer Özekinci*, Merve Özmen*, Abdurrahman Sarmış**, Mücahide Esra Koçoğlu*

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

** Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

Atf/Cite as: Çetin Ş, Özekinci T, Özmen M, Sarmış A, Koçoğlu ME. 2018-2021 yılları arasında Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi'nde kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin tür dağılımı ve gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):237-244.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi'nde yatan hastalara ait kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin tür dağılımı ve antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: Kan kültürü örnekleri BACT/ALERT 3D (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile 5 gün inkübe edilmiştir. Mikroorganizmaların identifikasyonu konvansiyonel yöntemler, VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) ve MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) otomatize sistemi kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerileri doğrultusunda VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dâhil edilen 65954 kan kültürü örneğinden 9323'ü (%14.1) bakteriyemi ve sepsis etkeni olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar arasında ilk sırayı koagülaz negatif stafilocoklar (%57.28) alırken, bunu *Escherichia coli* (%5.97), *Klebsiella* spp. (%5.50), *Staphylococcus aureus* (%4.56), *Enterococcus* spp. (%4.47), *Candida* spp. (%4.03), *Acinetobacter baumannii* (%3.74), *Pseudomonas aeruginosa* (%2.26), *Stenotrophomonas maltophilia* (%2.06), *Enterobacter* spp. (%1), *Streptococcus pneumoniae* (%0.25) izlemiştir. *Escherichia coli* ve *Enterobacter* spp. daha çok dahili servislerden, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* ise daha çok yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir. Gram negatif bakterilerde en etkili antibiyotiklerin kolistin, karbapenemler ve amikasin olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Kan dolaşımı enfeksiyonlarında saptanan etkenlerin antibiyotik duyarlılıkları hastanelere göre farklılık göstermektedir. Bu sebeple her merkezin belli aralıklarla epidemiyolojik verilerini analiz etmesinin akılcı antibiyotik kullanımına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kan kültürü, bakteri, antibiyotik duyarlılığı, epidemiyoloji

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to investigate the species distribution and antimicrobial resistance rates of bacteria isolated from blood cultures of inpatients at Prof. Dr. Süleyman Yalçın City Hospital.

Methods: Blood culture samples were incubated with the BACT/ALERT 3D (bioMérieux, France) automated system for 5 days. Microorganisms were identified using conventional methods, VITEK 2 (bioMérieux, France) and MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) automated system. Antibiotic susceptibility was evaluated with VITEK 2 (bioMérieux, France) in line with EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) recommendations.

Results: Of the 65954 blood culture samples included in the study, 9323 (14.1%) were evaluated as bacteremia and sepsis agents. Among the microorganisms isolated, coagulase negative staphylococci (57.28%) were leading, followed by *Escherichia coli* (5.97%), *Klebsiella* spp. (5.50%), *Staphylococcus aureus* (4.56%), *Enterococcus* spp. (4.47%), *Candida* spp. (4.03%), *Acinetobacter baumannii* (3.74%), *Pseudomonas aeruginosa* (2.26%), *Stenotrophomonas maltophilia* (2.06%), *Enterobacter* spp. (1%), and *Streptococcus pneumoniae* (0.25%). *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. were mostly isolated from internal services, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* were mostly isolated from intensive care units. It was determined that the most effective antibiotics against gram negative bacteria were colistin, carbapenems and amikacin.

Conclusion: Antibiotic susceptibility of agents detected in bloodstream infections differs according to hospitals. Therefore, it is considered that the analysis of epidemiological data by each center at regular intervals will contribute to the rational use of antibiotics.

Keywords: Blood culture, bacteria, antibiotic susceptibility, epidemiology

Alındığı tarih / Received:

07.04.2023 / 07.April.2023

Kabul tarihi / Accepted:

01.08.2023 / 01.August.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

Ş. Çetin 0009-0001-6266-5804
T. Özekinci 0000-0003-3475-660X
M. Özmen 0000-0002-8999-0893
A. Sarmış 0000-0002-8156-6633
M. E. Koçoğlu 0000-0002-2860-1794

✉ drsuleaytekin@gmail.com

GİRİŞ

Bakteriyemi ve sepsis, hastane enfeksiyonları arasında en sık karşılaşılan, invaziv girişimlere paralel olarak sıklığı artan enfeksiyonlardandır. Uygun antimikrobiyal tedavinin uygulanması geciktiğinde yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olabilen ağır enfeksiyonlardır⁽¹⁾. Bakteriyemi ve sepsis tanısında kan kültürü altın standarttır⁽²⁾. Ancak, örneğin alınma zamanından itibaren mikrobiyoloji laboratuvarlarının sonuç verme süresi, Gram boyama için aynı gün içinde olsa da, kan kültürü şişesinde üreyen mikroorganizmanın tanımlanması için ortalama iki gün, antimikrobiyal duyarlılık sonucunun çıkması ise üç günü bulmaktadır⁽³⁾. Bu nedenle klinisyenler genelde, klinik ve epidemiyolojik verilere dayanarak, örnek alındıktan hemen sonra ampirik antimikrobiyal tedaviye başlamaktadırlar⁽⁴⁾. Hastane enfeksiyonlarının tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de uygunsuz ampirik tedavilerin uygulanması sonucu son yıllarda giderek artan antimikrobiyal dirençtir⁽¹⁾. Doğru uygulanan tedavinin, hastane maliyetlerini azalttığı ve antimikrobiyal direncin yayılmasını önlediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle, kan dolaşımı enfeksiyonlarının erken tanı ve tedavisi klinik açıdan önem taşımaktadır⁽⁵⁾.

Son yıllarda, geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanların kullanımının artması, hastaların bağışıklık sisteminde baskılanma ve eşlik eden hastalıklardaki artış, kateter gibi invaziv tanı ve tedavi materyallerinin daha fazla kullanılması gibi sebeplerle kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma sayısında artış olduğu tespit edilmiştir⁽⁶⁾. Gram pozitif bakterilerden koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, gram negatif bakterilerden ise *Escherichia coli* ve diğer Enterobacterales üyeleri ile *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* kan kültürlerinden en sık izole edilen mikroorganizmalardır⁽⁷⁾. Bakteriyemiye neden olan mikroorganizmanın erken tanısı ve antimikrobiyal duyarlılık testinin belirlenmesi, klinisyenin uyguladığı ampirik tedaviye yön vermesi ve buna bağlı olarak doğru ve etkin antimikrobiyal tedavinin uygulanması açısından son derece önemlidir.

Bu çalışmada, hastanemizin çeşitli kliniklerinden gönderilen kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin tür dağılımı ve gram negatif bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testleri retrospektif olarak incelenmiştir. Böylece hastanemiz bünyesindeki örneklerde yıllara göre değişen antimikrobiyal direnç oranı belirlenerek dolaşım sistemi enfeksiyonlarında ampirik antimikrobiyal tedaviye katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Prof.Dr.Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (08.12.2021 tarih ve 2021/0627 sayı) onaylanmıştır.

Çalışmamızda Ocak 2018-Aralık 2021 tarihleri arasında Prof.Dr.Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen bakterilerin tür dağılımı ve gram negatif bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma süresince laboratuvarımıza 65.954 kan kültürü örneği gönderilmiştir. Bunların 13.142 (%19.9)'ünde üreme tespit edilmiştir. Laboratuvarımıza set şeklinde gönderilen kan kültürü örnekleri BACT/ALERT 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) otomatize sisteminde beş gün süreyle inkübe edilmiştir. Üreme sinyali veren şişelerden Gram boyama yapılmış ve örnekler %5 koyun kanlı agar, çikolatamsı agar, CHROMID agar (CPSElite, bioMérieux, Fransa) besiyerlerine ekilerek aerop şartlarda 37°C'de 18-24 saat süresince inkübe edilmiştir. Üreyen mikroorganizmaların identifikasyonu konvansiyonel yöntemler (Gram boyama, katalaz, koagülaz, oksidaz vb.), VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve MALDI-TOF MS (Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight mass spectrometry) otomatize sistemi kullanılarak yapılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılıkları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)⁽⁸⁾ önerileri doğrultusunda VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile değerlendirilmiştir. Karbapenem direnci gradient

test yöntemi (E-test; Bio-Mérieux, Fransa) ile üretici firmanın önerilerine göre doğrulanmıştır. Kolistin duyarlılığı ise mikrodilüsyon yöntemi (Merlin Diagnostika, Almanya) ile çalışılmıştır. Pozitif örneklerden 10 gün içinde aynı mikroorganizma üreyen numuneler, aynı epizodun suşu olarak değerlendirilerek saptanan ilk izolat çalışmaya dahil edilmiş; ayrıca tek sette *Bacillus anthracis* harici *Bacillus* türleri, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium spp.* üreyen örnekler kontaminasyon olarak değerlendirilerek çalışma dışı bırakılmıştır. Ayrıca gram pozitif bakterilerin üreme sayıları verilmele birlikte kontaminasyon ve enfeksiyon etkeni ayrımı yapılamadığı için gram pozitif bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları çalışmaya dahil edilmemiştir.

BULGULAR

Çalışmamız süresi boyunca laboratuvara gönderilen kan kültürü örneklerinden tek sette üreyen *B. anthracis* harici *Bacillus* türleri, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium spp.* üreyen örnekler kontaminasyon olarak değerlendirilerek çalışma dışı bırakılmış, çalışma süresince laboratuvarımıza gelen 65.954 kan kültürü örneğinin 9.323 (%14.1)'ünde

anlamli üreme tespit edilmiştir. Bu örneklerin yıllara göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

İzole edilen mikroorganizmaların yıllara göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir. En sık izole edilen gram negatif bakteriler *E. coli* ve *Klebsiella spp.* olmuştur. En sık izole edilen gram pozitif bakteriler KNS, *S. aureus* ve *Enterococcus spp.* olmuştur. Sık izole edilen gram negatif bakterilerin servislere göre dağılımı Tablo 3'te verilmiştir. *E. coli* ve *Enterobacter spp.* daha çok dahili servislere, *Klebsiella spp.*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'nın ise daha çok yoğun bakım ünitelerinden izole edildiği tespit edilmiştir.

En sık izole edilen gram negatif bakteriler *E. coli* ve *Klebsiella spp.*'nin antimikrobiyal direnç oranları Tablo 4'te, nonfermentatif bakterilerin antimikrobiyal direnç oranları ise Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 1. Yıllara göre değişen kan kültürü pozitiflik oranları

Yıl	n (%)
2018	2378 (16.7)
2019	2148 (13.5)
2020	2311 (12.15)
2021	2486 (14.6)
Toplam	9323 (14.1)

Tablo 2. İzole edilen mikroorganizmaların yıllara göre dağılımı [n (%)].

Etken	2018	2019	2020	2021	Toplam
Koagülaz negatif stafilokoklar	1410 (59.2)	1223 (56.94)	1411 (61.06)	1296 (52.13)	5340 (57.28)
<i>Escherichia coli</i>	145 (6.1)	144 (6.7)	135 (5.84)	133 (5.35)	557 (5.97)
<i>Klebsiella spp.</i>	139 (5.85)	134 (6.24)	103 (4.46)	137 (5.51)	513 (5.50)
<i>Staphylococcus aureus</i>	102 (4.29)	104 (4.84)	109 (4.72)	110 (4.42)	425 (4.56)
<i>Enterococcus spp.</i>	127 (5.34)	90 (4.19)	114 (4.93)	86 (3.46)	417 (4.47)
<i>Candida spp.</i>	85 (3.57)	78 (3.63)	108 (4.67)	105 (4.22)	376 (4.03)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	105 (4.42)	73 (3.4)	81 (3.5)	90 (3.62)	349 (3.74)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63 (2.65)	45 (2.09)	46 (1.99)	57 (2.29)	211 (2.26)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10 (0.42)	13 (0.61)	7 (0.3)	162 (6.52)	192 (2.06)
<i>Enterobacter spp.</i>	26 (1.09)	23 (1.07)	17 (0.74)	17 (0.68)	93 (1.00)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4 (0.17)	7 (0.33)	6 (0.26)	6 (0.24)	23 (0.25)
Toplam	2378 (100)	2148 (100)	2311 (100)	2486 (100)	9323 (100)

Tablo 3. Sık izole edilen gram negatif bakterilerin servislere göre dağılımı [n (%)].

Etken	YBÜ*	Dahili serviser	Cerrahi serviser	Toplam
<i>Escherichia coli</i>	118 (21.18)	339 (60.86)	100 (17.95)	557 (32.59)
<i>Klebsiella spp.</i>	240 (47.15)	208 (40.86)	61 (11.98)	509 (29.78)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	279 (79.94)	54 (15.47)	16 (4.58)	349 (20.42)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101 (47.87)	80 (37.91)	30 (14.22)	211 (12.34)
<i>Enterobacter spp.</i>	30 (36.14)	42 (50.6)	11 (13.25)	83 (4.85)
Toplam	768 (44.93)	723 (42.3)	218 (12.75)	1709 (100)

*YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

Tablo 4. İzole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının yıllara göre değişen antibiyotik direnç yüzdeleri (%)

	<i>Escherichia coli</i>				<i>Klebsiella spp.</i>			
	2018 (n=145)	2019 (n=144)	2020 (n=135)	2021 (n=133)	2018 (n=139)	2019 (n=134)	2020 (n=103)	2021 (n=137)
AK	1.46	0.72	0.77	9.09	22.58	25.38	22.22	20.59
AMC	49.62	52.38	45.79	54.2	62.18	57.6	60.53	71.11
AMP	79.55	72.73	72.88	75.57	100.0	100.0	100.0	100.0
CAZ	50	48.92	48.85	47.73	64.52	62.6	65.98	75.0
CIP	48.53	47.1	45.45	52.27	52.76	46.56	59.79	69.12
GN	17.91	20.44	21.21	21.21	38.21	32.31	29.29	25.0
ETP	1.52	2.31	0.78	3.85	36.07	37.5	34.69	54.48
IMP	0.0	0.0	0.83	0.0	40.0	32.41	25.0	69.23
MEM	0.75	0.73	0.78	0.76	30.65	32.31	29.29	50.0
TZP	19.85	16.91	13.64	22.31	50.0	49.62	48.0	65.44
SXT	52.94	46.04	41.22	46.56	60.48	59.54	43.88	66.18
COL	0.007	0.0	0.0	0.0	13.82	18.46	4.3	14.81

AK: Amikasin, AMC: Amoksisilin-Klavulanik asit, AMP: Ampisilin, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, GN: Gentamisin, ETP: Ertapenem, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, TZP: Piperasilin-Tazobaktam, SXT: Trimetoprim-Sülfametoksazol, COL: Kolistin.

Tablo 5. Sık izole edilen nonfermenter bakterilerin yıllara göre değişen antibiyotik direnç oranları (%)

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Acinetobacter baumannii</i>			
	2018 (n=63)	2019 (n=45)	2020 (n=46)	2021 (n=57)	2018 (n=105)	2019 (n=73)	2020 (n=81)	2021 (n=90)
AK	27.27	22.73	18.18	17.86	65.31	86.3	58.97	73.86
CAZ	27.27	37.78	24.44	26.79	89.01	91.78	88.46	81.82
CIP	37.04	35.56	26.67	32.14	84.95	97.1	93.15	80.9
GN	21.15	27.91	23.81	-	70.97	89.04	58.97	70.79
IMP	28.85	36.36	26.67	38.18	89.13	90.16	90.41	85.0
MEM	25.93	18.18	15.56	26.79	87.64	91.67	87.18	80.9
TZP	35.71	37.21	22.73	37.5	86.81	90.77	88.31	82.95
COL	9.62	2.27	2.22	0.0	2.25	5.48	0.0	0.0

AK: Amikasin, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, GN: Gentamisin, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, TZP: Piperasilin-Tazobaktam, COL: Kolistin.

TARTIŞMA

Bakteriyemi ve sepsis, erken tanı konulup tedavi edilmediği takdirde yüksek mortalite ve morbidite oranlarıyla seyreden önemli klinik tablolardır. Çalışmamız sonucunda hastanemizdeki sepsis etkeni bakteri türlerinin, gram negatif bakterilerin ise tür ve direnç oranlarının dört yıl içindeki dağılımını tespit etmiş bulunmaktayız. Yoğun bakım ünitelerinde dirençli nonfermentatif bakterilerin daha çok görülmesi yoğun bakımda enfeksiyon kontrol önlemlerine, antimikrobiyal tedavi yönetimine daha çok dikkat edilmesi gerektiği konusunu bir kez daha vurgulamaktadır.

Çalışmamızda dört yıllık süre içinde laboratuvarımıza gönderilen kan kültürlerinde pozitiflik oranı %14.1 olarak bulunmuştur. Bu alanda yapılan benzer çalışmalarda Er ve ark.⁽¹⁰⁾ %17.9, Arabacı ve ark.⁽¹¹⁾ %16.1, Gandra ve ark.⁽¹²⁾ %14, Atik ve ark.⁽¹³⁾ %12.8 kan kültürü pozitiflik oranı bildirmişlerdir. Çalışma sonuçlarındaki farklılığa büyük ölçüde, çalışma yapılan hasta popülasyonunun ve hastaların klinik durumlarının merkezlere göre değişkenlik göstermesi, kan alan personelin eğitim düzeyi, kültürün alındığı yer veya bölge ile ilgili sorunların neden olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda saptanan mikroorganizmaların en sık yoğun bakım ünitelerinde (%44.93) yatan hastalardan izole edildiği görülmüştür. Bunu dahili servisler takip etmekte, en düşük oranda da cerrahi servislerden gönderilen örneklerde üreme olmuştur. Şafak ve ark.⁽¹⁴⁾ da yaptıkları çalışmada kan kültürlerinde en sık (%56.4) üremenin yoğun bakım ünitelerinde olduğunu saptamıştır. Kılınç ve ark.⁽¹⁵⁾ yaptığı çalışmada *E. coli* izolatlarının %38'i, *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının %62'si, *P. aeruginosa* izolatlarının %63'ü, *Acinetobacter spp.* izolatlarının %86'sının yoğun bakım servislerinden izole edildiğini bildirmiştir. Bu durum, yoğun bakım ünitelerinde hastaların invaziv girişimlere daha çok maruz kalması, bir kısım hastanın immünsupresif durumda olması ve buna bağlı olarak bakteriyeminin daha çok görülmesi ve yatış sürelerinin cerrahi servislere göre daha uzun olmasıyla açıklanabilir.

Sepsise neden olan mikroorganizmaların dağılımında yıllar içerisinde farklılıklar olabilmektedir. 1980'li yıllardan itibaren gram pozitif mikroorganizmalar kan kültürlerinde en sık saptanan etkenler olarak yerini alırken, önceki yıllarda gram negatif etkenler daha çok tespit edilmiştir⁽¹⁶⁾. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda da kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar arasında gram pozitif bakterilerin oranı sırasıyla %64.1, %64.7, %80 olarak bildirilmiştir^(6,10,17). Farklı iki çalışmada ise gram negatif ve gram pozitif bakterilerin oranı sırasıyla %69.2, %27.3 ve %64.3, %30.9 olarak bildirilmiştir^(18,19). Kan kültürlerinde üreyen etkenlerin dağılımı ilgili merkezlerin çeşidi ve kapasitesine, bakteriyemi vakalarının kaynağının hastane veya toplum olmasına, katetere bağlı olup olmamasına, verilen antimikrobiyallere göre farklılık oluşturabilmektedir⁽⁶⁾. Bizim çalışmamızda da dört yıl boyunca üreme olan kan kültürü örneklerinde gram pozitif kok oranı %69.51 olarak bulunmuştur. Bunu gram negatif etkenler ve mayalar takip etmektedir. Ayrıca çalışmamızda en sık saptanan mikroorganizma KNS olmuştur. Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda da en sık izole edilen mikroorganizma KNS olarak bildirilmiştir^(15,19,20).

Ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalarda gram pozitif bakterilerden sonra kan kültürlerinden en sık izole edilen bakteriler içinde ilk sırayı *E. coli* almaktadır^(4,10,15,21,22). *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* ise gram negatif bakteriyemi ve sepsis etkenleri arasında sık görülen diğer mikroorganizmalardır⁽¹⁹⁾. İngiltere'deki laboratuvarların %90'ının katıldığı, 2004-2008 yılları arasında yapılan bir surveyans çalışmasında ise gram negatif bakteriyemilerin daha yüksek oranda görüldüğü ve *E. coli*'nin beş yılda %32 artarak her yıl en sık saptanan mikroorganizma olduğu bildirilmiştir⁽²³⁾. Bu çalışmada da KNS'den sonra ikinci sıklıkta saptanan bakteri *E. coli* (%5.97) olmuştur. *E. coli*'den sonra sırasıyla *Klebsiella spp.* (%5.5), *A. baumannii* (%3.74), *P. aeruginosa* (%2.26), *Stenotrophomonas maltophilia* (%2.06), *Enterobacter spp.* (%1)'nin görüldüğü tespit edilmiştir. *S. maltophilia* dışında etkenlerin görülme oranları ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile benzerdir. Bu durumun, hastanemizde 2021 yılı içerisinde hastane enfeksiyonu etkeni

olarak *S. maltophilia*'nın sık izole edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Doğada yaygın olarak bulunan nonfermentatif gram negatif bakteriler, çevre koşullarına dirençli ve çeşitli yüzeylerde kolonize olabilmeleri nedeniyle hastane ilişkili enfeksiyonlarda tehdit haline gelmiştir. Bu bakteriler özellikle hastanede yatan, immünsuprese hastalarda nozokomiyal patojenler olarak önemli enfeksiyonlara neden olurlar⁽²⁴⁾. Günümüzde bakteriyemiye neden olan nonfermentatif gram negatif bakterilerden en sık *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* görülmektedir. *S. maltophilia*, *Burkholderia spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Ralstonia spp.*, *Sfingobacterium spp.* yaygın olmayan diğer nonfermentatif gram negatif bakterilerdir⁽²⁵⁾. Bu çalışmada da nonfermenter gram negatif bakterilerden en sık görülen *A. baumannii* (%3.74) ve *P. aeruginosa* (%2.26) olmuştur.

Antimikrobiyal direnci dünya çapında büyük bir halk sağlığı sorunudur⁽¹²⁾. Özellikle invaziv enfeksiyonlarda artan antimikrobiyal direnci karbapenemlerin kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Çalışmamızda gram negatif bakterilerin antimikrobiyal direnç oranlarına bakıldığında ampicilin, amoksisilin-klavulanik asit, seftazidim, trimetoprim-sülfametoksazol ve siprofloksasine karşı yüksek direnç saptanırken, kolistin, karbapenemler ve amikasinin en etkili antimikrobiyal olduğu görülmüştür. *Klebsiella* türlerinde amikasin, gentamisin ve kolistin dışında diğer tüm antimikrobiyallere yüksek oranda direnç artışı olduğu görülmektedir.

Pseudomonas aeruginosa'da amikasin, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, meropenem ve piperasilin-tazobaktam da direnç %17.8-38.1 arasında değişmektedir. Kolistin direncinin çok düşük olduğu görülmektedir. *A. baumannii*'de ise kolistin hariç diğer tüm antimikrobiyallere yüksek oranda direnç tespit edilmiştir. Toplum kaynaklı enfeksiyonlarda yaygın kullanılan oral antimikrobiyallere direncin yüksek saptanması gayet beklenen bir durumken, hastane kaynaklı enfeksiyonlarda geniş spektrumlu antimikrobiyallerin ampirik olarak başlanması, hastaların yoğun bakıma gelineye kadar birçok

antimikrobiyal ilaç almış olmaları gibi sebepler bu bulgulara yol açmış olabilir.

“Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi”nin (UAMDSS) dahil olduğu Dünya Sağlık Örgütü Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı'nın (CAESAR) 2020 raporuna göre 2019 yılında Türkiye'deki kan ve beyin omurilik sıvısı izolatlarında saptanan gram negatif bakterilerde aminoglikozidler ve karbapenemlere karşı direnç oranlarının diğer antimikrobiyallere göre daha düşük olduğu görülmektedir. Karbapenem ve aminoglikozide direnç sırasıyla *E. coli* için %3 ve %2, *K. pneumoniae* için %39 ve %27, *P. aeruginosa* için %38 ve %14, *Acinetobacter spp.* için %90 ve %70 olarak bildirilmiştir⁽²⁶⁾. Kılınç ve ark.⁽¹⁵⁾ da 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının en duyarlı olduğu antimikrobiyalleri kolistin, imipenem ve amikasin, *Pseudomonas spp.* izolatlarının en duyarlı olduğu antimikrobiyalleri kolistin, amikasin ve gentamisin, *Acinetobacter spp.* izolatlarının en duyarlı olduğu antimikrobiyalleri ise amikasin ve trimetropim-sülfametoksazol olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada da son yılda gram negatif bakterilerin en duyarlı olduğu antimikrobiyaller sırasıyla *E. coli* için kolistin, karbapenemler ve amikasin, *Klebsiella spp.* için kolistin, amikasin ve gentamisin, *P. aeruginosa* için kolistin, amikasin ve meropenem, *A. baumannii* için kolistin olarak saptanmıştır. Çalışmalar arasında farklı oranların bulunması, çalışmanın yapıldığı tarih, ilgili çalışmanın ait olduğu merkezdeki hasta popülasyonu ve hastalara başlanan ampirik antimikrobiyal gruplarının hastaneler arası farklı olması ile ilişkilendirilebilir. Bunun yanında, kolistin için yıllar içinde azalan direnç oranlarının görülmesi, 2018 ve 2019 yıllarında mikrodilüsyon ile doğrulamanın tam olarak yapılamamasına bağlanmış, bu durum da çalışmamızın kısıtlılığını oluşturmuştur.

Sonuç olarak, kan dolaşımı enfeksiyonlarının tedavisinde klinisyene yol göstermesi açısından, her merkezde belirli aralıklarla buna benzer çalışmaların yapılması, hastanelerin enfeksiyon etkenlerini ve bakterilerin antimikrobiyal direnç paternini belirlemesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Böylece uygulanacak doğru ampirik tedavi protokolleri belirlenerek bakteriler arasında artan antimikrobiyal direncin önüne geçilmesi sağlanacaktır.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Prof.Dr.Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (08.12.2021 tarih ve 2021/0627 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Prof.Dr.Süleyman Yalçın City Hospital Clinical Research Ethics Committee (12.08.2021; 2021/0627).

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Öncül O. Hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3rd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008:575-604.
2. Başustaoğlu A, Yıldız SS, Mumcuoğlu İ, et al. Kan kültürü uygulamalarının değerlendirilmesi: İşletim sistemi (Epicenter) verilerinin kullanımı. Mikrobiyol Bul. 2019;53(1):12-21. <https://doi.org/10.5578/mb.67782>
3. Tabak YP, Vankeepuram L, Ye G, et al. Blood culture turnaround time in U.S. acute care hospitals and implications for laboratory process optimization. J Clin Microbiol. 2018;56(12):e00500-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00500-18>
4. Opota O, Croxatto A, Prod'homme G, et al. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. Clin Microb Infect. 2015;21(4):313-22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.003>
5. Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, et al. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72(1):20-31. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.015>
6. Gültekin E, Uyanık MH, HANCI H, et al. Kan kültürlerinden izole edilen nonfermentatif Gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2014;28(3):79-85. <https://doi.org/10.5222/ankem.2014.079>
7. Duman Y, Kuzucu Ç, Çuğlan SS. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Erciyes Tıp Dergisi. 2011;33(3):189-96.
8. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 11.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [https://www.eucast.org] (Erişim tarihi: 10.Haziran.2022).
9. Kreidl P, Kirchner T, Fille M, Heller I, LassFlörl C, Orth-Höller D. Antibiotic resistance of blood cultures in regional and tertiary hospital settings of Tyrol, Austria (2006-2015): Impacts & trends. PLoS One. 2019;14(10):e0223467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223467>
10. Er H, Aşık G, Yoldaş Ö, Demir C, Keşli R. Kan kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2015;45(1):48-54. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2015.048>
11. Arabacı Ç, Kutlu O. Evaluation of microorganisms isolated from blood cultures and their susceptibility profiles to antibiotics in five years period. J Surg Med. 2019;3(10):729-33. <https://doi.org/10.28982/josam.626480>
12. Gandra S, Mojica N, Klein EY, et al. Trends in antibiotic resistance among major bacterial pathogens isolated from blood cultures tested at a large private laboratory network in India, 2008-2014. Int J Infect Dis. 2016;50:75-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.002>
13. Kula Atik T, Özel Y, Yılmaz U, Ünlü M, Vardar Ünlü G. Kan kültürlerinden soyutlanan bakterilerin tanımlanması ve antimikrobiyal direnç oranlarının saptanması. ANKEM Derg. 2021;35(2):53-62. <https://doi.org/10.5222/ankem.2021.053>
14. Şafak B, Kılınç O. 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik Duyarlılıkları. Klimik Derg. 2016;29(2):60-4. <https://doi.org/10.5152/kd.2016.15>
15. 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.
16. Sümerkan B. Nozokomiyal sepsis. Etiyoloji ve mikrobiyolojik tanı. Hastane Enfeksiyon Derg. 1998;2:182-7.
17. Çopur-Çiçek A, Şentürk-Köksal Z, Ertürk A, Köksal E. Rize 82. Yıl Devlet Hastanesi'nde bir yıllık sürede kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Turk Hij Den Biyol Derg. 2011;68(4):175-84. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2011.66588>

17. Sağmak-Tartar A, Akbulut A. Bir infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniğinde tedavi edilen hastaların kan kültürü sonuçlarının değerlendirilmesi: Üç yıllık bir retrospektif analiz. *Klinik Derg.* 2018;31(3):218-22.
<https://doi.org/10.5152/kd.2018.53>
18. 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>
19. Öksüz Ş, Yavuz T, İdris Ş, et al. Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2008;38(3-4):117-21.
20. Şahin İ, Öztürk E, Yavuz MT, et al. Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Düzce Tıp Dergisi.* 2013;15(2):11-4.
21. 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):104702.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104702>
22. Wilson J, Elgohari S, Livermore DM, et al. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004-2008. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(3):451-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03262.x>
23. Hazirolan G, Gür H. Kan kültürlerinden izole edilen nonfermentatif Gram negatif bakterilerin dağılımının ve antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi. *ANKEM Derg* 2019;33(2):49-57.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2019.1915>
24. Rattanaumpawan P, Ussavasodhi P, Kiratisin P, Aswapokee N. Epidemiology of bacteremia caused by uncommon non-fermentative gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis.* 2013;13:167.
25. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/167>
26. World Health Organization (WHO)/Europe. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2020. [<https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2020-3469-43228-60585>] (Erişim tarihi: 20.Mart.2023).

Ağız Çalkantı Suyunda *Candida* Türlerinin Belirlenmesinde Real-Time PCR Testinin Tanı Değeri

Diagnostic Value of The Real-Time PCR Test for The Identification of *Candida* Species in Oral Rinse Solutions

Petek Çürük*, Ayşe Sultan Karakoyun*, Nevzat Ünal**, Şehnaz Yılmaz***, M. Emre Benlidayı****, Ertan Kara*****, M. Macit İlkit*

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

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

*** Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

**** Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

***** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Atıf/Cite as: Çürük P, Karakoyun AS, Ünal N, et al. Ağız çalkantı suyunda *Candida* türlerinin belirlenmesinde real-time PCR testinin tanı değeri. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):245-257.

Öz

Amaç: Sağlıklı insanların ağız florasında maya mantarları da dahil olmak üzere birçok mikroorganizma bulunur. Bu denge halinin bozulması maya mantarlarının kolonizasyonuna veya ağız içi kandidoza sebep olabilir. Sunulan çalışmada, ağız florasında tıbbi önemi olan *Candida* türlerinin tanımlanması için real-time PCR (RT-PCR) yönteminin tanı değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 200 öğrenci çalışmaya dahil edildi. Katılımcılardan alınan konsantre ağız çalkantı suyu örnekleri steril eküvyonlu çubuk ile CHROMAgar *Candida* (CAC) besiyerine inoküle edildi. İzole edilen *Candida* türlerinin identifikasyonunda CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS yöntemleri kullanıldı.

Bulgular: Toplam 52 (%26) klinik örnekten 68 maya mantarı izole edildi. En sık izole edilen türler, sıklığı göre, *C. albicans* (%36.1), *C. parapsilosis* (%21.3), *C. dubliniensis* (%14.7), *C. lusitanae* (%9.8), *C. kefyr* (%8.2), *C. lambica* (%3.3) ve %6.6 diğer *Candida* türleri idi. Ağız içi mantar kolonizasyonu kullanılan diş macunu markası ile ilişkili bulundu ($p = 0.02$). Çalışmada izole edilen *Candida* türlerinden *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica* dışındaki türler RT-PCR'ı takiben erime sıcaklığı analizi (MCA) ile belirlendi. Ancak, *C. albicans* ve *C. kefyr*, erime sıcaklıklarına (melting tempature, T_m) göre birbirinden ayırt edilemedi.

Sonuç: *Candida* türlerinin geleneksel yöntemler ile belirlenmesi ve birbirinden ayırt edilmesi 2–3 gün sürebilmektedir. İzole edilen *Candida* türlerinin RT-PCR analizini takiben MCA ile tanımlanması basit, ucuz ve çabuk bir yöntemdir. Ancak, çalışmada RT-PCR'ın *Candida* türlerinin kesin tanısı için (*C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica*) yeterli olmadığı görüldü.

Anahtar kelimeler: *Candida*, MALDI-TOF MS, real-time PCR

ABSTRACT

Objective: A variety of microorganisms are found in the oral cavities of healthy humans, including yeast fungi. Disruption of the balance among these microorganisms may cause excessive yeast colonization, or oral candidosis. In the present study, we aimed to investigate the diagnostic value of a real-time PCR method for the identification of medically important *Candida* species in the oral flora.

Methods: Two hundred students from Çukurova University Faculty of Dentistry participated in this study. The concentrated oral rinse water samples from the participants were inoculated into CHROMagar *Candida* (CAC) medium with a swab. CAC along with RT-PCR and MALDI-TOF MS were used to identify the *Candida* species.

Results: A total of 68 yeast fungi were isolated from 52 (26%) clinical samples. The most common isolated species were *C. albicans* (36.1%), *C. parapsilosis* (21.3%), *C. dubliniensis* (14.7%), *C. lusitanae* (9.8%), *C. kefyr* (8.2%), *C. lambica* (3.3%) and other *Candida* species (6.6%). Oral colonisation of yeast fungi was associated with the toothpaste brand ($p=0.02$). The *Candida* species isolated in this study were reliably identified by RT-PCR melting curve analysis (MCA), except *C. albicans*, *C. kefyr* and *C. lambica*. However, this method could not distinguish *C. albicans* and *C. kefyr* based on their peak melting temperatures (T_m).

Conclusion: It may take 2–3 days for *Candida* species to be identified and differentiated from each other using conventional methods. MCA of *Candida* species using RT-PCR, which can be accomplished in a single day, is a simple, inexpensive, and rapid method. However, this study revealed that RT-PCR was not reliable in the identification of *Candida* species (*C. albicans*, *C. kefyr*, and *C. lambica*).

Keywords: *Candida*, MALDI-TOF MS, real-time PCR

Alındığı tarih / Received:
28.03.2023 / 28.March.2023

Kabul tarihi / Accepted:
16.08.2023 / 16.August.2023

Yayın tarihi / Publication date:
08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

P. Çürük 0000-0002-8687-7772
A. S. Karakoyun 0000-0002-2717-6343
N. Ünal 0000-0001-5121-3100
Ş. Yılmaz 0000-0002-6742-5690
M. E. Benlidayı 0000-0002-6102-9136
E. Kara 0000-0003-2486-8683
M. M. İlkit 0000-0002-1174-4182

✉ macitilkit@gmail.com

GİRİŞ

Son 20 yılda, *Candida* ve kandidozların bildirilmesinde önemli artış olduğu bilim çevrelerinin dikkatini çekmiştir. Ancak, sadece invazif kandidozlar ile ilgili olmayıp yüzeysel kandidozları (orofarengiyal, vulvo-vaginal, intertrigo, onikomikoz, paroniki, kronik mukokütanoz) da kapsamaktadır. Bu durum, kuşkusuz bağışıklık sistemi baskılanmış popülasyonda (lösemi, lenfoma, HIV/AIDS, steroid kullanımı, diabetes mellitus vb.) artış ile açıklanabilir^(1,2). Bununla birlikte, *Candida*'ların laboratuvar tanısında önemli ilerlemeler kaydedilmiş, polifazik taksonomik araştırmaların yanında yeni besiyerleri geliştirilmiş (kromojenik agarlar), yeni *Candida* türleri tanımlanmış (*Candida auris*) ve yeni moleküler temelli testler (PCR, RFLP, RT-PCR) uygulamaya girmiştir⁽³⁻⁶⁾. Ayrıca, tıbbi mikoloji ve klinik mikoloji alanında farkındalık artmış ve hemen her ülkede referans laboratuvarların kurulmasına yönelik adımlar atılmıştır. Ulusal ve uluslararası ölçekte eğitim faaliyetleri önem kazanmıştır. Halen yeterli düzeyde olmasa da klinisyen-mikrobiyolog iş birliği desteklenmiş ve geliştirilmiştir. Sonuç olarak, mantar hastalıklarının tanı ve tedavisine ilişkin farkındalık yaratılmıştır.

Modern tıbbın günümüzdeki tüm imkânlarına karşılık, mantar hastalıklarının tanı ve tedavisine ilişkin sorunlar devam etmektedir. Bir mantar enfeksiyonunun başarılı yönetimi çabuk ve güvenilir tanı yanında uygun antifungal tedaviye hemen başlanması ile mümkündür. Global Action for Fungal Infections (GAFFI), 2025 yılı itibari ile mantar hastalıklarının %95'inin tanınmasını ve yine %95'inin tedavi edilebilmesini hedeflemiştir. Klinik ve mikolojik tanı etkenin tür düzeyinde tanımlanması ile geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır. Tür düzeyinde tanı, bölgesel epidemiyolojik özelliklerin belirlenmesinin yanında kişi odaklı tedavide de önemli adımların atılmasını sağlayacaktır. Ancak, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere mikolojik tanı sorunu halen devam etmektedir⁽⁷⁾.

Sunulan çalışmada, hem yüzeysel hem de invazif mikoz etkeni *Candida* cinsi maya mantarlarının çabuk ve doğru tanısı için bir algoritma oluşturulması

hedeflenmiştir. Bu amaçla, RT-PCR testinin tür düzeyinde tanıda değeri ve elde edilen bulguların CHROMagar *Candida* (CAC) besiyeri ve matris aracılı lazer desorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-ToF MS) yöntemleri ile karşılaştırılması ve literatür eşliğinde tartışmaya açılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.10.2013 tarih ve 25/5 sayı) onaylanmıştır.

Çalışma popülasyonu ve klinik örneklerin alınması: Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde eğitim gören ve rastgele seçilen 200 öğrenci çalışmaya dâhil edildi. Katılımcılara 10–15 ml steril distile su verilerek ağızlarını çalkalamaları istendi⁽⁸⁾. Ağız çalkantı suyu örnekleri steril kapaklı 15 ml'lik falkon tüplerine alınarak en kısa sürede Tıbbi Mikoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Klinik örnekler, 5–6 Haziran 2022 tarihleri arasında toplandı. Çalışmaya katılmayı kabul eden öğrencilere diş fırçalama alışkanlığı, diş macunu markası, diş taşı varlığı, gece plağı kullanımı, hareketli dental protez kullanımı, sigara tüketimi ile geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu varlığını sorgulayan kısa bir anket çalışması yapıldı ve katılımcılardan aydınlatılmış onam belgesi alındı.

Klinik örneklerden maya mantarlarının izolasyonu: Klinik örnekler 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırılarak pelletin üzerine 400 µL steril distile su eklendi⁽⁸⁾. Elde edilen konsantre ağız çalkantı suyu örneklerinden steril eküvyonlu çubuk ile CAC besiyerine seyreltme/tek koloni ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 36°C'de 48–72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri üreme varlığı/yokluğu, koloni morfolojileri ve pigmentasyonu ile çoklu mantar üremesi yönünden değerlendirildi⁽⁹⁾. Mantar üremesi tespit edilen kültürlerden saf koloni elde etmek amacıyla Sabouraud glikoz agar (SGA, Merck, Darmstadt, Almanya)'a pasajları yapıldı ve tüm ileri işlemlerde kullanıldı.

Maya mantarlarının tür düzeyinde identifikasyonu:

(a) CHROMAgar *Candida* (CAC) besiyeri: Üretici firmanın önerilerine göre koloni renk ve morfolojileri doğrultusunda besiyerleri değerlendirildi ve buna göre, yeşil (*Candida albicans*), metalik mavi (*Candida tropicalis*), kuru pembe (*Candida krusei*), lila/kahverengi (*Candida glabrata/Candida kefyr*) ve beyaz (diğer *Candida* türleri) olarak kabul edildi ve tür ön tanıları kaydedildi⁽⁹⁾.

(b) MALDI-TOF MS yöntemi: Maya mantarlarının tür düzeyinde tanımlanmasında referans olarak MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanıldı. Taze kültürlerden tanımlanması yapılacak koloniden 1 µL alınıp 96'lık MALDI kaset kuyusuna konuldu ve oda ısısında kuruması bekledi. Sonrasında üzerine 1 µL %70'lik formik asit ve biyomarkerların tespiti için matriks solüsyonu (α -siyano-4-hidroksisinamik asit) eklendi ve tekrar oda ısısında kuruması için bekledi. Kuruyan kaset kuyularındaki örnekler cihaza yerleştirilip analiz işlemine başlandı. Cihaz ölçüm değerleri üreticinin talimatlarına göre; 2.3–3 arası log-skor değeri yüksek doğrulukta tür düzeyinde tanı, 2–2.29 arası skor güvenilir cins ve olası tür düzeyinde tanı, 1.7–1.99 arası olası cins düzeyinde tanı ve 0–1.69 arası skor ise güvenilir olmayan tanı şeklinde değerlendirildi⁽¹⁰⁾.

(c) Real-time PCR: DNA izolasyonu için üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazır DNA izolasyon kitleri (Zymo Research, Irvine, CA, ABD; Katalog No: D6005) kullanıldı. RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verildi.

RT-PCR analizi, Kalıtım Sağlık Moleküler Tanı Laboratuvarında (Teknokent, Sarıçam, Çukurova Üniversitesi) yer alan cihaz ile (Mx3000P Real-time PCR System, Brookprinter PlacePoway, CA, ABD), ITS2 bölgesine özgül UNF1-F ve UNF2-R primer çifti ile yapıldı. RT-PCR için hazır 5xMaster Mix (Solis BioDyne, Teaduspargi, Estonya) solüsyonu kullanıldı. PCR karışımı 20 µL hacim içinde hazırlandı. Konsantrasyonları 10 pmol/µL olan forward ve reverse primerlerden 0.5 µL eklendi. Her örnek için 1 µL (10 ng/µL) genomik DNA kullanıldı⁽⁵⁾.

Tablo 1. RT-PCR ile *Candida* türlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer kodu	Primer dizisi (5'→3')
UNF1 Forward	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
UNF2 Reverse	5'-TTG ATA TGC TTA AGT TCA GCG G-3'

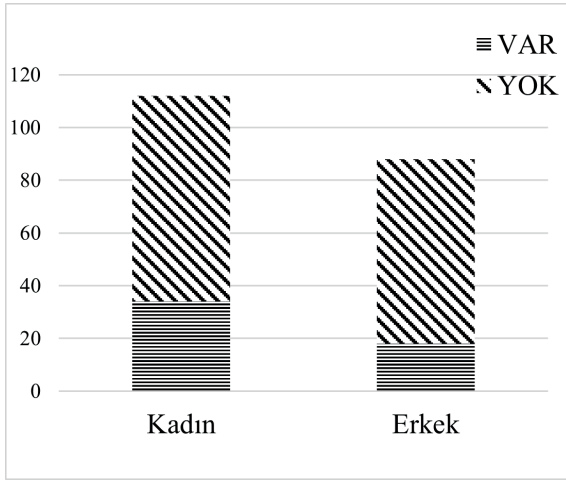
Referans izolatlar: Sunulan çalışmada, *C. krusei* ATCC 6258, *Candida inconspicua* CBS 13938, *C. tropicalis* CBS 13933, *C. albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *C. glabrata* ATCC 90030 ve *Candida dubliniensis* MI 19941 olmak üzere yedi referans izolat incelendi. Referans izolatlar, CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS ile değerlendirildi.

İstatistiksel analiz: Çalışma verilerinin girilmesi ve analizi için "Statistical Package for the Social Sciences IBM SPSS Statistics 22.0" istatistik programı kullanıldı. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde, sayısal değişkenler ise ortalama ve standart sapma olarak verildi. Çapraz tablolar için, Pearson ki-kare testi kullanılarak istatistiksel anlamlılık belirlendi. Normal dağılıma uymamalarından dolayı tek değişkenli analizlerde Mann-Whitney U ve Kruskal Wallis testi kullanıldı. Analizler %95 güven aralığında çalışıldı. Tüm analizlerde, $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya katılmayı kabul eden 200 katılımcının 112'si kadın (%56) ve 88'si erkek (%44) olup yaş ortalaması 23 (yaş aralığı, 19–36) idi. Mantar üremesi belirlenen 52 kişinin 34'ü (%65.4) kadın ve 18'i (%34.6) erkek idi. Katılımcıların cinsiyet ve maya kolonizasyonuna göre dağılımları Şekil 1'de verildi.

Anket Bulguları: Kullanılan diş macunu markası açısından A grubu ticari marka diş macunu kullananlar ile başka ticari marka diş macunu kullananlara göre maya mantarı üreme varlığı ve yokluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu ($p=0.02$). Ağız çalkantı suyunda maya mantarı varlığının diş taşı olanlarda olmayanlara göre 2.28 kat fazla olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 1. Çalışma grubunun cinsiyet ve ağız içi maya mantarı varlığına göre dağılımları.

olmadığı görüldü ($p=0.09$). Ayrıca, ağız içi mantar kolonizasyonu ile diş fırçalama alışkanlığı, gece plağı kullanımı, hareketli dental protez kullanımı, sigara kullanımı ve geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu arasında anlamlı derecede ilişki bulunmadı ($p>0.05$). Anket sonuçları ile mantar kültürlerinde maya mantarı üreme varlığı arasında ilişki Tablo 2’de verildi.

Mikolojik bulgular: Katılımcılardan alınan 200 konsantre ağız çalkantı suyu örneğinde 52 (%26) klinik örnekten 68 maya mantarı izole edildi. Kültür-pozitif 52 klinik örneğin, 41’inde (%78.8) monofungal ve 11’inde (%21.2) polifungal popülasyon görüldü. Polifungal üremelerin altısında iki farklı maya türü, beşinde ise üç farklı maya türü vardı. Bu 68 maya

Tablo 2. Ağız çalkantı suyunda maya mantarı varlığı ve yokluğunun anket verilerine göre karşılaştırılması

	Üreme var n (%)	Üreme yok n (%)	p değeri
Diş fırçalama alışkanlığı			
Günde bir kez	11 (%21.1)	20 (%13.5)	>0.1
Günde iki kez	37 (%71.2)	112 (%75.7)	
Günde üç kez	4 (%7.7)	16 (%10.8)	
Kullanılan diş macunu markası			
A markası	8 (%15.4)	47 (%31.8)	0.02
Diğer markalar	44 (%84.6)	101 (%68.2)	
Diş taşı varlığı			
Var	17 (%32.7)	31 (%67.3)	0.09
Yok	35 (%20.9)	117 (%79.1)	
Gece plağı kullanımı			
Var	1 (%50.0)	1 (%50.0)	0.45
Yok	51 (%25.8)	147 (%74.2)	
Hareketli dental protez kullanımı			
Var	0 (%0.0)	2 (%100.0)	0.55
Yok	52 (%26.3)	146 (%73.7)	
Sigara tüketimi			
Var	21 (%31.3)	46 (%68.7)	0.24
Yok	31 (%23.3)	102 (%76.7)	
Geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu			
Var	42 (%26.4)	117 (%73.6)	0.79
Yok	10 (%24.4)	31 (%75.6)	

mantarından 61'i (%89.7) *Candida* spp. olup izole edilen türler, sıklığa göre, 22 *C. albicans* (%36.1), 13 *C. parapsilosis* (%21.3), 9 *C. dubliniensis* (%14.7), 6 *C. lusitaniae* (%9.8), 5 *C. kefyr* (%8.2), 2 *Candida lambica* (%3.3) ve 4 (%6.6) diğer *Candida* türleri [1 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. inconspicua* ve 1 *Candida pararugosa*] idi. Maya mantarlarının tür dağılımları Tablo 3'te verildi.

Tablo 3. MALDI-TOF MS ile tanımı doğrulanan maya mantarlarının türlere göre dağılımı

İzolasyon	Pozitif (n)
Monofungal (N=41)	
<i>Candida albicans</i>	17
<i>Candida dubliniensis</i>	6
<i>Candida parapsilosis</i>	8
<i>Candida krusei</i>	-
<i>Candida kefyr</i>	3
<i>Candida tropicalis</i>	-
<i>Candida lusitaniae</i>	2
<i>Candida inconspicua</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1
Polifungal (N=11)	
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida pararugosa</i>	1
<i>Candida tropicalis</i> + <i>Candida lambica</i> + <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1
<i>Candida krusei</i> + <i>Candida lambica</i> + <i>Yarrowia lipolytica</i>	1
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida kefyr</i>	1
<i>Candida dubliniensis</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	1
<i>Candida dubliniensis</i> + <i>Candida kefyr</i>	1
<i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida lusitaniae</i>	1
<i>Candida albicans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida lusitaniae</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	2
<i>Candida dubliniensis</i> + <i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida lusitaniae</i>	1
Toplam	52

Ayrıca, CAC besiyerinde 1 *C. tropicalis* kökeni yeşil koloni oluşturdu ve *C. albicans* olarak yanlış identifiye edildi. Bu çalışmada, ağız çalkantı örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin (n=61) CAC ve RT-PCR yöntemi ile tür tanımlamalarının karşılaştırılması MALDI-TOF MS yöntemi referans alınarak yapıldı ve Tablo 4'te sunuldu.

Moleküler bulgular: Referans izolatların RT-PCR analizi ile elde edilen amplifikasyon grafikleri, erime sıcaklığı eğrileri ve erime pikleri Şekil 2a-c'de gösterildi. Klinik izolatlar ve referans suşların aynı zamanda ve tek seferde analizlerine ilişkin veriler ise Şekil 3a-c'de sunuldu.

Monofungal izolatların RT-PCR analizinden elde edilen Tm değerleri Şekil 4'te birlikte değerlendirildi. Polifungal popülasyon belirlenen örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin Tm değerleri ise Tablo 5'te bir arada verildi. Ancak, *C. lambica* olarak identifiye edilen iki izolata polifungal popülasyonda yer almalarına karşılık, RT-PCR ile amplifiye olmamaları sebebiyle Tablo 5'te yer verilmedi.

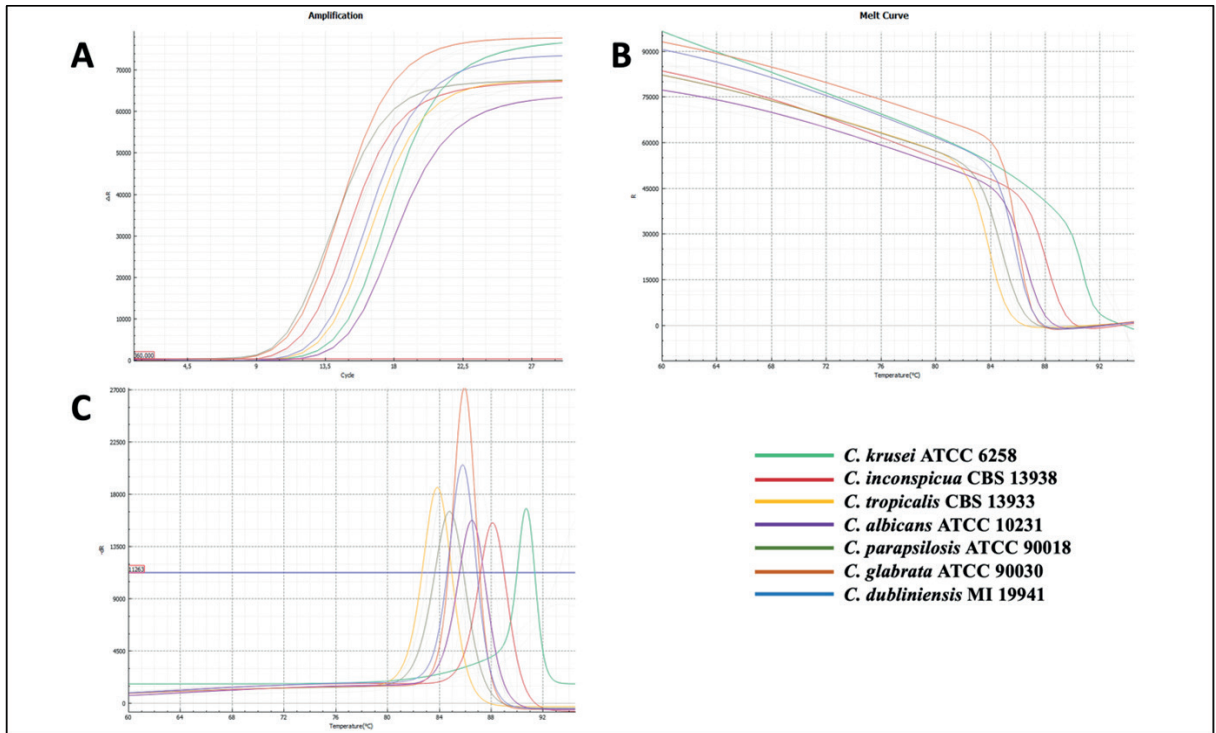
TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, sağlıklı gönüllülerin konsantre ağız çalkantı örneklerinde maya mantarlarının kolonizasyon oranları %26 (52/200) iken, sırası ile, %20.5'i (41/200) monofungal, %5.5'i ise (11/200) polifungal popülasyon idi. Bu kolonizasyon oranları, literatür verilerine kıyasla (%39–58.6 aralığında) daha düşük bulundu⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Buna karşılık, Yang ve ark.⁽¹⁶⁾ 323 sağlık bölümü öğrencileri ve personelleri ile yaptıkları çalışmada, sonuçlarımıza kıyasla daha düşük (%15.3) oranda maya kolonizasyonu bildirmişlerdir. Katılımcıların Diş Hekimliği Fakültesi öğrencileri olması sebebi ile ağız ve diş temizliği konusundaki hassasiyet ve alışkanlıkları daha düşük izolasyon oranına sebep olmuş olabilir. Aynı zamanda, literatürde ağızda maya kolonizasyonunu belirlemek için ağız çalkantı suyu^(12,13), konsantre ağız çalkantı suyu⁽¹⁵⁾, tükürük⁽¹¹⁾ ve steril sürüntü çubukları^(14,16) ile örneklerin alındığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Klinik örnek alma yöntemlerinin izolasyon oranlarını etkileyebileceği de bilinmektedir⁽¹⁷⁾.

Tablo 4. CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS sonuçlarının karşılaştırılması

Mantar	CAC Pozitif (n)	RT-PCR Pozitif (n)	MALDI-TOF MS Pozitif (n)
<i>Candida albicans</i>	23	22 ^a	22
<i>Candida dubliniensis</i>	9	9	9
<i>Candida krusei</i>	1	1	1
<i>Candida kefyr</i>	-	5 ^a	5
<i>Candida tropicalis</i>	-	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	-	13	13
<i>Candida inconspicua</i>	-	1	1
<i>Candida lusitanae</i>	-	6	6
<i>Candida pararugosa</i>	-	1	1
<i>Candida lambica</i>	-	-	2
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	-	-	2
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	2
Diğer mantar türleri (beyaz koloni)	35	9	-
Toplam	68	68	68

^aC. albicans ve C. kefyr diğer türlerden ayırt edilebildi, ancak T_m (°C) göre birbirlerinden ayırt edilemedi (Bkz. Şekil 4). CAC: CHROMagar Candida.



Şekil 2. Referans izolatların RT-PCR analizi sonucu elde edilen (A) amplifikasyon grafikleri, (B) erime sıcaklığı eğrileri ve (C) erime pikleri.

ilişki sunan çalışmalara^(13,14) karşılık, çalışmamıza benzer olarak istatistiksel farklılık görülmeyen çalışmalar da bildirilmiştir^(11,12,15). Ağız içi hijyen alışkanlıkları (diş fırçalama sıklığı, diş macunu seçimi, aparat kullanımı gibi) mikroorganizma yüküne ve virülansına etki ederek ağız sağlığının korunmasına katkı sağlar⁽¹⁷⁾. Çalışmamızda diş fırçalama alışkanlığı, diş taşı varlığı ve gece plağı kullanımı gibi değişkenlerin kolonizasyon üzerine anlamlı bir etkisi belirlenmemesine karşılık, diş macunu seçiminin anlamlı bir fark oluşturduğu görüldü (Tablo 2). Bu durumun sebebi farklı markaların farklı aktif bileşen ve konsantrasyonlara sahip olması olabilir⁽¹⁸⁾.

Sağlıklı insanların ağız florasında maya mantarları da dâhil olmak üzere birçok mikroorganizma denge ve uyum içindedir. Bu denge halinin (i) bağışıklığın baskılanması, (ii) antibiyotik kullanımı ve (iii) farklı beslenme alışkanlıkları gibi durumlarda bozulması maya mantarlarının kolonizasyonuna veya ağız içi kandidoza sebep olabilir⁽¹⁷⁾. *C. albicans* ağız boşluğundan ve diğer mukoza yüzeylerinden en sık izole edilen *Candida* türüdür^(17,19). Çalışmamızda izole edilen mantar türlerinden %32.4'ü (22/68) *C. albicans* idi. Benzer çalışmalarda, bizim sonuçlarımıza kıyasla daha yüksek (%48–89 aralığında) *C. albicans* oranları bildirilmiştir⁽¹¹⁻¹⁵⁾.

Rivera ve ark.⁽¹⁵⁾ 96 sağlıklı gönüllünün konsantre ağız çalkantı suyunda maya kolonizasyonunu inceledikleri çalışmalarında izole edilen maya kolonilerini 28S rRNA sekans analizi ile tanımladıklarında en sık izole edilen

üç türü, sırası ile, *C. albicans* (%52.0), *C. parapsilosis* (%17.9) ve *C. dubliniensis* (%7.5) olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmamızda elde edilen %13.2 (9/68) *C. dubliniensis* izolasyon oranı ile uyumludur. Ancak, ağızda maya kolonizasyonunu irdeleyen başka çalışmalarda ise *C. dubliniensis* bildirilmemiştir^(11,12,14). Söz konusu çalışmalarda identifikasyon amacıyla yalnızca fenotipik yöntemlerin kullanılması *albicans*-dışı *Candida* türlerinin yanlışlıkla *C. albicans* olarak tanımlanmasına sebep olabileceği düşünüldü.

Klinik örneklerden izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türlerinden biri de *C. parapsilosis* olup özellikle kandidemilerde en sık rastlanan ikinci *Candida* türü olarak bildirilmektedir⁽¹⁹⁻²¹⁾. Özellikle, flukonazol dirençli *C. parapsilosis* ülkemiz için giderek büyüyen bir sorundur⁽²¹⁾. Çalışmamızda, *C. albicans*'ı takiben en sık izole edilen tür *C. parapsilosis* (%19.1, 13/68) idi. *C. parapsilosis*'in deride flora üyesi olduğundan sağlık çalışanlarının elleri aracılığı ile (horizontal bulaş) yayıldığı ve hastane enfeksiyonlarına sebep olduğu düşünülmektedir^(21,22).

Çalışmamızda 11 (%5.5) katılımcıda polifungal popülasyon belirlendi. Rivera ve ark.⁽¹⁵⁾ polifungal popülasyon oranını (en çok *C. albicans* + *C. parapsilosis*) %21.8 olarak bildirmişlerdir. Bu oran, benzer bazı çalışmalarda ise %7.1–11.2 olarak sunulmuştur⁽¹¹⁻¹³⁾. Çalışmamızda baskın birliktelik olarak tarif edebileceğimiz bir tür dağılımı dikkati çekmedi, ancak önceki verilere kıyasla polifungal popülasyon oranı daha düşük idi. Ayrıca, *C. albicans*

Tablo 5. Polifungal popülasyondan izole edilen *Candida* türlerinin RT-PCR ile elde edilen Tm (°C) değerleri*

DNA No	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parugosa</i>
33	87.2		84.8			
107	87.2					84.1
169		86.3			85.6	
175				87.9	85.5	
181		86.2	84.9			
186	87.1			87.8	85.5	
189		86.3		87.9	85.5	
190	87.1			87.9	85.6	

*Toplam 11 polifungal popülasyon belirlenmesine karşılık yalnızca *Candida* türü olan ve amplifiye edilebilen izolatları içermektedir.

ve *C. glabrata*'nın birlikte kolonizasyonunun ağız epiteline invazyonu ve doku hasarını artırdığı bilinmektedir^(17,23). Bununla birlikte, diğer mantar türlerinin bir arada bulunmasının virülans özelliğine katkısı üzerine daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Rivera ve ark.⁽¹⁵⁾ çalışmaları sonucu aynı kişide birden fazla sayıda mantar kolonizasyonunun ağız içi aparat kullanımı ($p = 0.016$) ve kötü ağız hijyeni (O'Leary index, $p=0.012$) ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızın sonuçlarımıza benzer olarak Yang ve ark.⁽¹⁶⁾ polifungal popülasyon oranını %6.1 olarak bildirmişlerdir. Bu durumun, seçilen örneklem grubunun ağız ve diş bakımı konusunda görece bilinçli bir popülasyon olması ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Wang ve ark.⁽²⁴⁾ ağız içi kandidozu şüphesi olmayan sağlıklı ve hastanede yatan toplam 1.799 kişiden steril pamuklu çubukla ağız sürüntü örnekleri aldıkları çalışmada katılımcıların 415'inde (%23.1) maya kolonizasyonu rapor etmişlerdir. ITS dizi analizi sonucunda en sık izole edilen türler *C. albicans* (%42), *C. tropicalis* (%20), *C. glabrata* (%5.5) ve *C. parapsilosis* (%4.1) olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda tanımlanan maya türlerinin dağılımına yaş, doğum yeri, ikametgâh yeri ve mevcut sağlık durumu gibi faktörlerin katkıda bulunduğu, ancak cinsiyet ve etnik kökenin etki etmediğini bildirmişlerdir⁽²⁴⁾. Sonuç olarak, izole edilen türlerin dağılımı, çalışma popülasyonlarına ve kullanılan tür tanımlama yöntemlerine göre farklılık gösterebilir.

Sow ve ark.⁽²⁵⁾ 218 maya izolatinin identifikasyonunda geleneksel yöntemler (germ-tüp testi, Mısır unlu-Tween 80 agarda yapısal özelliklerin değerlendirilmesi ve API 20C kiti) ile MALDI-TOF MS yönteminin tür düzeyinde tanımlamalarını karşılaştırmışlardır. Geleneksel yöntemlerle 208 (%95.4) izolati, MALDI-TOF MS yöntemi ile de 214 (%98.1) izolati doğru tanımlamışlardır. Ayrıca, geleneksel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlamaya (24–48 saat) kıyasla MALDI-TOF MS yönteminin daha kısa sürede sonuç vermesi (1 saat) ve izolat başına maliyetinin daha ucuz olması vurgulanmıştır. MALDI-TOF MS yönteminin, maya mantarlarının identifikasyonunda %90'ın üzerinde özgüllüğe sahip olduğu bilinmektedir^(25,26). Ancak, *Aspergillus* ve *Mucorales* gibi küf mantarlarının identifikasyonunda bu yöntemin tanı değeri sınırlı olup güvenilir değildir⁽²⁷⁾.

Real-time PCR cihazları amplifiye olan DNA miktarını, işlem sırasında floresan işaretli problarla hibridizasyon sonucu tespit edebildiği gibi DNA molekülüne bağlanan SYBR® Green gibi boyalar ile de yapabilmektedir⁽²⁸⁾. Boya kullanımı problemlardan çok daha ucuz olmasına karşılık, çift zincir DNA molekülüne non-spesifik bağlanması gibi sakıncaları da vardır⁽²⁹⁾. RT-PCR sonrası erime sıcaklığı analizi (MCA) yapılarak bu sorunun üstesinden gelinebilmektedir. Günümüzde RT-PCR için hazırlanmış hidroliz ve hibridizasyon problemleri içeren tanı kitleri *Candida*'ların rutin analizi için kullanılmaktadır⁽³⁰⁾. Tm değeri, PCR sonucu elde edilen çift zincir DNA moleküllerinin yarısının tek zincir DNA moleküllerine dönüştüğü

Tablo 6. Çalışmada referans ve klinik isolatlar ile elde edilen RT-PCR MCA sonuçları ile literatür verilerinin karşılaştırılması

<i>Candida</i> türleri	Bu çalışma Tm (°C)	Somogyvári ve ark. ⁽³²⁾ Tm (°C)	Gutzmer ve ark. ⁽³³⁾ Tm (°C)	Horvath ve ark. ⁽³¹⁾ Tm (°C)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	91.0	90.8	91.5	89.8
<i>Candida inconspicua</i> CBS 13938	88.8	88.0	-	-
<i>Candida lusitanae</i> [§]	87.2	86.1	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	87.1	87.1	87.5	87.1
<i>Candida kefyr</i> [§]	86.4	-	-	-
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	85.9	84.9	86.3	-
<i>Candida dubliniensis</i> MI 19941	86.1	85.5	-	85.5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	85.4	85.4	84.9	85.4
<i>Candida tropicalis</i> CBS 13933	84.8	84.5	84.7	84.5

[§]: Klinik izolat

sıcaklık değeridir⁽³¹⁾. MCA yöntemi ile analizini yaptığımız dokuz *Candida* türünün Tm değerlerinin üç farklı grubun verileri ile karşılaştırılması Tablo 6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında MCA'nın tercih edilebilir bir seçim olduğu sonucuna varılabilir⁽³²⁻³⁴⁾. Decat ve arkadaşları ITS2 bölgesine özgü primerler kullanarak 16 *Candida* türünü RT-PCR'dan sonra erime sıcaklığı analizi ile aynı gün içerisinde birbirinden ayırt etmeyi başarmıştır⁽³⁵⁾.

Son yıllarda, High Resolution Melting Analysis (HRMA, yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi) yöntemi Tıbbi Mikrobiyoloji disipliniinde sıklıkla kullanılmaktadır⁽³⁶⁾. PCR ile elde edilen amplikondaki G-C miktarı (%) arttıkça erime sıcaklığı (Tm) da yükselmekte olup amplikondaki tek baz değişimi dahi HRMA yöntemi ile belirlenmektedir. Bu yöntemde yüksek konsantrasyonlarda DNA polimerazı (Taq Polymerase) inhibe etme özelliği olmayan, çift zincir DNA molekülüne çok iyi bağlanabilen özel boyalar (LCGreen® ve EvaGreen® gibi) kullanılır. HRMA ile amplikon boyunu da hesaba katan geliştirilmiş yazılım programı ile erime sıcaklığı belirlenir. RT-PCR HRMA özellikle nokta mutasyonlarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle kısa amplikonlarda (50–300 bp) güvenilir sonuçlar alınırken uzun PCR ürünlerinde çoklu erime pikleri elde edilmekte olup kesin tanıyı güçleştirmektedir^(36,37).

Günümüzde bazı araştırmacılar *Candida* türlerinin belirlenmesinde RT-PCR HRMA yöntemini tercih etmektedir^(32,34,38,39). Nemcova ve ark.⁽³⁴⁾ RT-PCR HRMA yöntemi ile bir çift primer kullanarak 25 mantar türünü incelemiş ve bunlardan dokuz *Candida* türü için aldığı sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir. Her *Candida* türünün Tm değerinin bu çalışmada RT-PCR MCA ile bulduğumuz Tm değerlerinden yaklaşık 4°C daha düşük olduğu ve bu durumun yöntem farkından kaynaklanabileceği düşünüldü (Tablo 7). Ancak, Somogyvári ve ark.⁽³²⁾ HRMA yöntemini kullanarak sekiz mantar türü için elde ettiği Tm değerlerinin diğer HRMA sonuçlarından 2°C kadar farklı olduğu açıkça görülmektedir (Tablo 7). Bu farkın kullanılan PCR master miks ve değerlendirmeyi yapan yazılım programından kaynaklandığı düşünülmektedir. HRMA yöntemi ile her *Candida* türünün Tm derecesi MCA yönteminden daha düşük hesaplandığından 90°C üzerindeki Tm değerlerine sahip *Aspergillus* türlerinden kolayca ayırım yapılmasına imkan sağlamıştır^(32,40).

Bu çalışmada, MALDI-TOF MS ile 10 farklı *Candida* türü belirlendi, ancak *C. lambica* olarak tanımlanan iki klinik izolatin DNA'sı RT-PCR ile amplifiye edilemedi. Nemcova ve ark.⁽³⁴⁾ da aynı primer çifti ile RT-PCR HRMA yöntemiyle *C. lambica*'nın amplifiye olmadığını bildirmiştir. Yazarlar, *C. lambica* referans

Tablo 7. Çalışmada referans ve klinik izolatlar ile belirlenen RT-PCR MCA sonuçları ile literatürde bildirilen HRMA sonuçlarının karşılaştırılması

<i>Candida</i> türleri	Fragment uzunluğu	GC oranı	Somogyvári ve ark. ⁽³²⁾ HRMA	Nemcova ve ark. ⁽³⁴⁾ HRMA	Bu çalışma MCA	
	(b.ç.)	(%)	Tm (°C)	Tm (°C)	Tm farkı ⁽³⁴⁾	Tm (°C)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	336	55	88.6	86.6	4.4	91.0
<i>Candida inconspicua</i> CBS 13938	295	52	86.4	84.6	4.2	88.8
<i>Candida lusitanae</i> §	244	50	85.4	83.6	3.6	87.2
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	326	47	84.5	82.9	4.2	87.1
<i>Candida kefyr</i> §	422	46	—	82.6	3.8	86.4
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	408	46	83.2	81.7	4.2	85.9
<i>Candida dubliniensis</i> MI 19941	331	46	83.5	82.0	4.1	86.1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	300	43	82.6	81.5	3.9	85.4
<i>Candida tropicalis</i> CBS 13933	317	40	81.8	79.4	5.4	84.8

§: Klinik izolat; MCA: Erime sıcaklığı analizi; HRMA: Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi.

izolatını HRMA ile tanımlamış, ancak üç klinik izolatın amplifiye edilememesini primer bağlanma yöresindeki dizi değişikliğine bağlamıştır⁽³⁴⁾.

Sunulan çalışmada, literatürde de olduğu gibi, HRMA ve MCA yöntemi ile Tm değerlerinin çok yakın olduğu türlerin ayrımı yapılamadı. Şöyle ki; *C. albicans* ve *C. kefyr* aynı Tm derecelerine (°C) sahip olduğu için CAC besiyerinde farklı renkte koloni oluşturmaları sebebi ile tanı konuldu ve bu sonuç MALDI-TOF MS yöntemi ile doğrulandı. HRMA ve MCA, reaktiflerinin ucuzluğu, her RT-PCR cihazına uygunluğu ve kısa sürede sonuç vermesi sebebi ile son yıllarda tercih edilmektedir⁽⁴¹⁾.

Bu çalışmada, klinik örneklerden önce CAC ile hem mantar kültürü yapıldı hem de üç *Candida* türü (*C. albicans*, *C. dubliniensis* ve *C. krusei*) ön tanı düzeyinde belirlendi. Önce, referans izolatlar ile reaksiyon koşulları (PCR) optimize edildi. Sonra, maya kolonilerinden izole edilen DNA ile *C. lambica* hariç tüm izolatların Tm değerleri belirlendi ve tür tayinleri yapıldı. Ayrıca, *C. albicans* ve *C. kefyr*, Tm değerlerine göre ayırt edilemedi. MALDI-TOF MS sonuçları ile karşılaştırıldığında RT-PCR yönteminin *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica* tanısı için güvenilir olmayacağı görüldü. Bu sebeple *Candida* cinsi maya mantarlarının laboratuvar tanısında polifazik ayrımın önemi anlaşıldı ve özenle vurgulanmasına ihtiyaç duyuldu.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.10.2013 tarih ve 25/5 sayılı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TF2013D3 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Cukurova University, Medical Faculty, Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee (10.11.2013; 25/5).

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

Funding: Cukurova University Scientific Research Coordination Office with project number TF2013D3.

KAYNAKLAR

1. Caceres DH, Mohd Tap R, Alastruey-Izquierdo A, Hagen F. Detection and control of fungal outbreaks. *Mycopathologia*. 2020;185(5):741-5. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00494-1>
2. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi*. 2017;3:5. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
3. Dendis M, Horváth R, Michálek J, et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(12):1191-202. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00719.x>
4. Ayhancı T, Altındış M. Hızla yayılan çoklu ilaca dirençli maya mantarı: *Candida auris*. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2020;77(1):123-36. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.26879>
5. Zhang J, Hung GC, Nagamine K, Li B, Tsai S, Lo SC. Development of *Candida*-specific real-time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. *Microbiology Insights*. 2016;9:21-8. <https://doi.org/10.4137/MBI.S38517>
6. Consortium OPATHY, Gabaldón T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(5):517-47. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz015>
7. GAFFI. Global Fund for Fungal Infections. [<https://gaffi.org>] (Erişim tarihi: 22.Mart.2023).
8. Takagi Y, Fukano H, Shimozaoto K, et al. Genotypes of *Candida albicans* isolated from healthy individuals and their distribution in patients with oral candidiasis. *J Infect Chemother*. 2013;19(6):1072-9. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0626-5>
9. Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demirhindi H. Performance of Chromogenic Candida agar and CHROMagar Candida in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Med Mycol*. 2010;48(1):29-34. <https://doi.org/10.3109/13693780802713224>
10. Marklein G, Josten M, Klanke U, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2912-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00389-09>

11. Gerós-Mesquita Â, Carvalho-Pereira J, Franco-Duarte R, et al. Oral *Candida albicans* colonization in healthy individuals: prevalence, genotypic diversity, stability along time and transmissibility. J Oral Microbiol. 2020;12(1):1820292.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1820292>
12. Genc GE, Ozel S, Erturan Z. Sağlıklı kişilerde oral *Candida* kolonizasyonu sıklığının araştırılması. ANKEM Derg. 2014;28(1):26-31.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2014.026>
13. Mun M, Yap T, Alnuaimi AD, Adams GG, McCullough MJ. Oral candidal carriage in asymptomatic patients. Aust Dent J. 2016;61(2):190-5.
<https://doi.org/10.1111/adj.12335>
14. Moalic E, Gestalin A, Quino D, Gest PE, Zerili A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationship with dental caries. Caries Res. 2001;35(2):149-55.
<https://doi.org/10.1159/000047447>
15. Rivera RE, Zuluaga A, Arango K, et al. Characterization of oral yeasts isolated from healthy individuals attended in different Colombian dental clinics. J Biomed Res. 2019;33(5):333-42.
<https://doi.org/10.7555/JBR.33.20180067>
16. Yang YL, Leaw SN, Wang AH, Chen HT, Cheng WT, Lo HJ. Characterization of yeasts colonizing in healthy individuals. Med Mycol. 2011;49(1):103-6.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.487076>
17. Patel M. Oral cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the development of infection. Pathogens. 2022;11(3):335.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11030335>
18. Yigit N, Aktas E, Ayyildiz A. Antifungal activity of toothpastes against oral *Candida* isolates. J Mycol Med. 2008;18(3):141-6.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.06.003>
19. Seyedmousavi S, İlkit M, Durdu M, et al. *Candida* ve kandidoz: Epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2015;45(1):1-11.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2015.001>
20. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JC. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):606-25.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
21. Arastehfar A, Hilmioğlu-Polat S, Daneshnia F, et al. Clonal candidemia outbreak by *Candida parapsilosis* carrying Y132 F in Turkey: evolution of a persisting challenge. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:676177.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.676177>
22. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, et al. *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2):e00111-18.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
23. Silva S, Henriques M, Hayes A, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an *in vitro* oral epithelium. J Oral Pathol Med. 2011;40(5):421-7.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00981.x>
24. Wang H, Xu J, Guo H, et al. Patterns of human oral yeast species distribution on Hainan Island in China. Mycopathologia. 2013;176(5-6):359-68.
<https://doi.org/10.1007/s11046-013-9703-7>
25. Sow D, Fall B, Ndiaye M, et al. Usefulness of MALDI-TOF Mass Spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. Mycopathologia. 2015;180(3-4):173-9.
<https://doi.org/10.1007/s11046-015-9905-2>
26. Pereira LC, Correia AF, da Silva ZDL, et al. Vulvovaginal candidiasis and current perspectives: new risk factors and laboratory diagnosis by using MALDI-TOF for identifying species in primary infection and recurrence. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021;40(8):1681-93.
<https://doi.org/10.1007/s10096-021-04199-1>
27. Li Y, Wang H, Zhao YP, Xu YC, Hsueh PR. Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for identification of *Aspergillus* species directly from growth on solid agar media. Front Microbiol. 2017;8:1209.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01209>
28. Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of realtime quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagn. 2005;5(2):209-19.
<https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
29. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. Clin Chim Acta. 2015;439:231-50.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
30. Wang K, Peng H, Wang B. Recent advances in thiol and sulfide reactive probes. J Cell Biochem. 2014;115(6):1007-22.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24762>
31. Horváth Á, Pető Z, Urbán E, Vágvolgyi C, Somogyvári F. A novel, multiplex, real-time PCR-based approach for the detection of the commonly occurring pathogenic fungi and bacteria. BMC Microbiol. 2013;13:300.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-300>
32. Somogyvári F, Horváth A, Serly J, Majoros H, Vágvolgyi C, Peto Z. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. In Vivo. 2012;26(6):979-83.

33. Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 12):1207-14.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.45779-0>
34. Nemcova E, Cernochova M, Ruzicka F, Malisova B, Freiburger T, Nemec P. Rapid identification of medically important *Candida* isolates using high resolution melting analysis. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116940.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116940>
35. Decat E, Van Mechelen E, Saerens B, et al. Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA). *Res Microbiol*. 2013;164(2):110-7.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.017>
36. Tong SYC, Giffard PM. Microbiological applications of high resolution melting analysis. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3418-21.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01709-12>
37. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003;49(6 Pt 1):853-60.
<https://doi.org/10.1373/49.6.853>
38. Arancia S, Sandini S, De Bernardis F, Fortini D. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(3):283-5.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.003>
39. Nawar NN, Behiry IK, Yousef RHA, Emara MA. Application of high-resolution melting PCR to detect the genomic fungal ITS 2 region. *Lab Med*. 2020;51(1):66-73.
<https://doi.org/10.1093/labmed/lmz034>
40. Nejad EE, Nejad Almani PG, Mohammadi MA, Salari S. Molecular identification of *Candida* isolates by real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(10):e23444.
<https://doi.org/10.1002/jcla.23444>
41. Zhang B, Izadjoo M. Differential diagnosis of *Candida* species with real-time polymerase chain reaction and melting temperature analyses (RTPCR-MTA). *Mil Med*. 2015;180(6):652-9.
<https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00294>

Kistik Ekinokokkoz Şüpheli Hastaların Tanısında İndirekt Hemaglutinasyon ve İmmünokromatografik Yöntemin Karşılaştırılması

The Comparison of Indirect Hemagglutination and Immunochromatographic Methods In Diagnosis of Patients with Cystic Echinococcosis Doubt

Duygu Öztaş[®], Fahriye Ekşi[®], Tekin Karşılığil[®]

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

Atıf/Cite as: Öztaş D, Ekşi F, Karşılığil T. Kistik ekinokokkoz şüpheli hastaların tanısında indirekt hemaglutinasyon ve immünokromatografik yöntemin karşılaştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):258-264.

Öz

Amaç: *Echinococcus granulosus* kist halinde çoğunlukla karaciğere, nadiren de akciğer ve diğer organlara yerleşerek kistik ekinokokkoz hastalığına yol açan bir etkindir. Bu çalışma kistik ekinokokkoz (KE) şüphesi ile gönderilen hastaların serum örneklerinde *E.granulosus* antikor varlığının indirekt hemaglutinasyon (IHA) ve immünokromatografik test (ICT) yöntemleriyle araştırılarak bu yöntemlerin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Çalışmaya 01/11/2018-31/01/2019 tarihleri arasında KE şüphesiyle gönderilen 75 hastaya ait kan örneği dahil edilmiştir. *E.granulosus* IgG antikor varlığı IHA ve ICT yöntemleri kullanılarak çalışılmıştır. IHA yöntemiyle 1/160 ve üzeri sulandırımındaki reaksiyon pozitif olarak kabul edilmiş iken ICT yöntemiyle kaset üzerinde yalnızca kontrol çizgisinin oluşması negatif, kontrol çizgisinin yanı sıra test çizgisinin oluşması pozitif olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: IHA yöntemiyle hastaların %48'i, ICT yöntemiyle %45.4'ü pozitif olarak saptanmıştır. IHA ile pozitif olarak saptanan hastaların da %94.4'ünün ICT yöntemiyle de pozitif olduğu görülmüştür. IHA yöntemi ile negatif olarak saptanan hastaların tamamı (n = 39) ICT yöntemiyle de negatif saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmadan elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda KE şüpheli hastalarda IHA ve ICT sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu görülmüş olmakla beraber testlerin etkinliğinin belirlenebilmesi için daha geniş serum paneli ile çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *Echinococcus granulosus*, kistik ekinokokkoz, IHA, ICT

ABSTRACT

Objective: *Echinococcus granulosus* is a causative agent of cystic echinococcosis (CE) by settling as cysts mostly in the liver and rarely in the lung and other organs. The aim of this study was to investigate the presence of *E. granulosus* antibodies in serum samples of patients with suspected cystic echinococcosis (CE) by indirect haemagglutination (IHA) and immunochromatographic test (ICT) methods and to compare these methods.

Methods: Blood samples of 75 patients with suspected CE between 01/11/2018-31/01/2019 were included in the study. The presence of *E.granulosus* IgG antibody was analysed using IHA and ICT methods. With the IHA method, the reaction at a dilution of 1/160 and above was considered positive, while with the ICT method, the formation of only the control line on the cassette was considered negative, and the formation of the test line as well as the control line was considered positive.

Results: 48% of the patients were found positive by IHA method and 45.4% by ICT method. It was observed that 94.4% of the patients who were found positive by IHA were also positive by ICT method. All of the patients who were found to be negative by IHA method (n = 39) were also found to be negative by ICT method.

Conclusion: Considering the results obtained from the study, it was observed that IHA and ICT results were compatible with each other in patients with suspected CE, but studies with a larger serum panel are needed to determine the effectiveness of the tests.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, cystic echinococcosis, IHA, ICT

Alındığı tarih / Received:

19.03.2021 / 19.March.2021

Kabul tarihi / Accepted:

21.08.2023 / 21.August.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

D. Öztaş 0000-0003-3229-5459

F. Ekşi 0000-0003-2245-7979

T. Karşılığil 0000-0001-7672-3625

✉ oztasduyg27@gmail.com

GİRİŞ

Echinococcus'lar Taeniidae familyasında yer alan, oldukça küçük yapıli sestoqlardır. Bu grup içerisinde yer alan *Echinococcus granulosus* türünün erişkin formları köpek ve köpekgillerin ince bağırsağında, larva formları da başta koyun ve sığır gibi otçullar olmak üzere bazı memelilerin ve insanların organlarında parazit olarak bulunur⁽¹⁾. Cestoda sınıfında yer alan *Echinococcus* cinsine ait erişkin parazit türleri 1.2-8mm uzunlukta olup vücutları baş, boyun ve halkalar şeklinde üç bölümden meydana gelir⁽²⁾. *Echinococcus* cinsine ait türlerde yumurtalar karakteristik olarak yuvarlak-ovalimsi şekilde olup kapaksızdır. İçerisinde tam gelişmiş olan altı çengelli, embriyofor adı verilen kabukla çevrelenmiş onkosfer adı verilen heksakant embriyon bulunur⁽³⁾. Kesin konaktan dışarı atılan yumurtanın içerisindeki embriyon gelişmiş durumdadır ve dış ortama karşı da son derece dayanıklıdır. Enfektivitelerini çok düşük sıcaklıklarda (+4-+15°C) bile birkaç ay ile birkaç yıl kadar korumaktadırlar. 2°C sıcaklıktaki dış ortamda 1.5-2 yıl boyunca canlı kalabilmekte olup güneş ışınlarına karşı hassas, kuruluğa karşı ise duyarlıdırlar. Yüzde 25'lik bağıl nemde, kuru ortamlarda ve yüksek sıcaklık değerlerinin olduğu ortamlarda (60-80°C) dört gün veya dakikalar içerisinde ölmektedirler⁽⁴⁾.

Kistik ekinokokkozis (KE), Taeniidae ailesine ait *E. granulosus*'un neden olduğu bir hastalıktır. Antarktika dışında dünya çapında dağılım gösteren ve her yerde bulunan zoonotik bir ajandır. KE, tarım ve hayvancılık faaliyetlerinin yaygın bir şekilde yürütüldüğü bölgelerde son derece sık rastlanan, çoğunlukla köpek dışkısıyla insanlara bulaşan, başta karaciğer olmak üzere akciğer ve diğer organlarda da yerleşim göstermekte olan önemli paraziter hastalıklardandır⁽⁵⁾.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) değerlendirmelerine göre KE, hayvansal kaynaklı ihmal edilmiş 17 tropikal hastalıktan biri olarak listelenmiş ve insanlarda görülen en ciddi paraziter hastalıklar arasında kaydedilmiştir. Enfeksiyon, son konak köpeğin dışkısıyla atılan parazit yumurtalarının insan, koyun, keçi, sığır gibi doğal ara konaklar tarafından sindirim ve solunum yoluyla alınmasıyla gerçekleşebilir.

Enfeksiyöz kistler en sık karaciğerde yerleşir; akciğer, dalak ve böbrek gibi çeşitli organ ve dokularda da görülür⁽⁶⁾.

Tüm dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de insan ve hayvan sağlığı açısından önemli paraziter hastalıklar arasında yer alan KE'nin özellikle Akdeniz havzasında endemik olduğu bilinmektedir. Türkiye'de neredeyse tüm bölgelerde görülmekte olan ve insanları enfekte etme yeteneği son derece yüksek hayvansal kaynaklı hastalıklardan birisidir. Görülme sıklığı açısından ülkemiz 5. sırada yer almakta olup bölgelere göre ülkemizde KE görülme sıklığı değişmektedir. İç Anadolu, Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgeleri ise KE açısından endemik olan bölgelerdir⁽⁷⁾.

Dünyanın birçok ülkesinde görülmekte olan KE'nin endemik olarak görüldüğü bölgeler ise Afrika, Avrasya, Orta Asya, Orta Doğu, Avustralya, ABD, Yeni Zelanda ve Güney Amerika'nın bazı bölgeleridir. İzlanda ve Grönland gibi ada ülkelerinde ise hiç rastlanmadığı bildirilmiştir^(8,9).

Klinik genellikle asemptomatiktir; kistlerin büyüklüğüne ve lokalizasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. KE tanısı esas olarak görüntüleme yöntemleri ile konur. Hemen hemen tüm organ yerleşimlerinde bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans kullanılırken, karaciğer kistlerinde USG, akciğer kistlerinde ise direkt grafi ilk tercih olmuştur. Kistin diğer yer kaplayan lezyonlarla ayırıcı tanısının yapılması, ameliyat sonrası nükslerin belirlenmesi ve net bir klinik tablonun olmaması gibi durumlarda radyolojik tanı yöntemlerinin serolojik tanı yöntemleri ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Ayrıca serolojik testler sadece KE tanısında değil, toplumdaki prevalansının belirlenmesinde ve asemptomatik bireylerin tespitinde de kullanılmaktadır. Serolojik tanıda, spesifik immünoglobulin G antikorlarının tespit edildiği indirekt hemaglutinasyon (IHA), enzime bağlı immünosorbent test (ELISA), lateks aglutinasyon, indirekt floresan antikor (IFA) ve immüno blotlama (IB) yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda CE tanısı için hızlı sonuç veren immünokromatografik (ICT) yöntemin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır⁽⁷⁾.

Çalışmamızda kistik ekinokokkoz şüphesiyle gönderilen hastaların serum örneklerinde *E. granulosus* antikor varlığının IHA ve ICT ile araştırılarak serolojik tanı yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma öncesinde Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (10.10.2018 tarih ve 2018/269 sayı).

Çalışmaya 2018 Kasım ile 2019 Şubat tarihleri arasında hastanemiz Mikrobiyoloji Laboratuvarına KE şüphesi ile gönderilmiş olan %64'ü (n=48) kadın, %36'sı (n=27) erkek olmak üzere toplam 75 hastanın serum örneği dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 42.08±17.72 olarak hesaplanmış olup %2.7'si (n = 2) 16 yaş altında, %52'si (n = 39) 16-44 yaş arasında, %45.3'ü (n = 34) de 45 yaş ve üzerinde idi. Çalışma kapsamına alınan hastaların %41.3'ü (n = 31) genel cerrahi, %14.7'si (n = 11) gastroenteroloji, %14.7'si (n = 11) göğüs cerrahisi, %16.5'i de (n = 22) diğer polikliniklerden gönderilen hastalardan oluşmaktadır.

Hasta serumlarında *E. granulosus*'a spesifik antikor varlığı IHA testi (Echinococcosis, Fumouze Diagnostics, Paris, Fransa) ve İmmunokromatografik testi (ICT) (Virapid hydatidosis, Vircell, Spain) ile üretici firmaların önerileri doğrultusunda çalışıldı. IHA yöntemi ile 1/160 ve üstü sulandırımındaki reaksiyon pozitif kabul edildi. ICT ile kaset üzerinde yalnızca kontrol çizgisinin oluşması negatif reaksiyon, kontrol çizgisinin yanı sıra bir çizginin daha oluşması ise pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen veriler SPSS (Version 16.0) programı kullanılarak analiz edilmiş olup yüzdelik değerler, ortalama ve standart sapma değerleri tanımlayıcı istatistikler olarak verilmiştir. Yöntemlerin pozitif ve negatiflik durumlarına göre yapılan karşılaştırmalar için ki-kare analizi ve bağımsız örneklem t testi kullanılmış olup p<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda IHA yöntemi ile 75 hastanın %48'inde (n = 36) *E. granulosus*'a spesifik antikorlar pozitif, %52'si (n = 39) negatif olarak saptanmış iken ICT ile %45.3'ü (n = 34) pozitif, %54.7'ssi (n = 41) ise negatif bulunmuştur. IHA yöntemi ile pozitif bulunan 36 hastadan 34'ü (%94.4) ICT yöntemiyle de pozitif bulunmuş iken IHA yöntemi ile negatif olarak saptanan hastaların tamamı (n = 39; %100) ICT yöntemiyle de negatif bulunmuştur. Çalışmamızda aynı zamanda IHA yöntemiyle pozitif saptanan hastaların %5.6'sı (n = 2) ICT yöntemiyle negatif, %94.4'ü (n = 34) ise pozitif bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Ekinokokkoz tanısında indirekt hemagglütinasyon ve immunokromatografik test sonuçlarının dağılımı

	IHA (-) n (%)	IHA (+) n (%)	Toplam
İmmunokromatografik test (-)	39 (%100.0)	2 (5.6)	41
İmmunokromatografik test (+)	0 (%0.0)	34 (%94.4)	34
Toplam	39 (%100.0)	36 (%100)	75

IHA: İndirekt hemagglütinasyon testi

Tablo 2. Ekinokokkoz tanısında indirekt hemagglütinasyon ve immunokromatografik test pozitif ve negatif hastalarda yaş ortalaması

	N	Ortalama ± Standart sapma	t	p
İndirekt hemagglütinasyon testi				
Pozitif	36	38.44 ± 16.97	-1.729	.08
Negatif	39	45.44 ± 17.96		
İmmunokromatografik test				
Pozitif	41	45.00 ± 17.77	1.582	.11
Negatif	34	38.56 ± 17.27		

İndirekt hemaglutinasyon yöntemiyle negatif saptanan hastaların yaş ortalaması, pozitif saptanan hastalara göre anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). ICT yöntemiyle negatif saptanan hastaların yaş ortalamasının, pozitif olarak saptananlara göre daha yüksek olduğu görülse de ICT pozitif ve negatif hastalar arasında yaş ortalaması açısından anlamlı farklılık olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır (Tablo 2).

İndirekt hemaglutinasyon yöntemi ile pozitif saptanan hastaların 23'ü (%63.9) kadın, 13'ü (%36.1) erkek, negatif saptanan hastaların 25'i (%64.1) kadın, 14'ü (%35.9) erkek olup cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). ICT yöntemiyle pozitif saptanan hastaların 21'i (%61.8) kadın, 13'ü (%38.2) erkek, negatif saptanan hastaların 27'si (%65.9) kadın, 14'ü (%34.1) erkek olup cinsiyet dağılımı açısından farkın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$) (Tablo 3).

İndirekt hemaglutinasyon yöntemi ile pozitif saptanan hastaların %44.44'ü ($n = 16$) kırsal, %55.56'sı ($n = 20$) kentsel yerleşim birimlerinden gelen hastalar iken, negatif bulunan hastaların %17.95'i ($n = 7$) kırsal, %82.05'i ($n = 32$) ise kentsel yerleşim birimlerinden gelen hastalardı. ICT pozitif saptanan hastaların ise %44.1'i ($n = 15$) kırsal, %55.89'u ($n = 19$) kentsel alanlardan, ICT negatif saptanan hastaların ise %17.95'i ($n = 7$) kırsal, %82.05'i ($n = 32$) kentsel yerleşim birimlerinden gelen hastalardı (Tablo 4).

Tablo 4. Echinococcosis indirekt hemaglutinasyon ve immunokromatografik test ile pozitif ve negatif hastaların yaşadıkları yere göre dağılımı

IHA	Kırsal n (%)	Kentsel n (%)
Pozitif (N=36)	16 (44.4)	20 (55.56)
Negatif (N=39)	7 (17.95)	32 (82.05)
ICT	Kırsal n (%)	Kentsel n (%)
Pozitif (N=34)	15 (44.11)	19 (55.89)
Negatif (N=39)	7 (17.95)	32 (82.05)

TARTIŞMA

Kistik ekinokokkoz dünya geleninde ve Türkiye'de halk sağlığını ciddi şekilde etkileyen ve hayvanların doku ve organlarında neden olduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklardan ötürü önemli kayıplara neden olabilen zoonotik paraziter bir enfeksiyondur⁽¹⁰⁾.

Sosyoekonomik düzeyi ve sağlık standartları düşük, hayvancılık faaliyetlerinin yaygın olduğu bölgelerde çok daha yüksek görülme oranına sahip olup çiftçiler, çobanlar, köpek sahipleri, avcılar ve veteriner hekimlerde sıkça görülmektedir. Türkiye'de başta Doğu Anadolu Bölgesi olmak üzere Güneydoğu ve İç Anadolu bölgelerinde oldukça yaygındır⁽⁷⁾.

Tablo 3. Cinsiyete göre ekinokokkoz tanısında indirekt hemaglutinasyon ve immunokromatografik test sonuçlarının karşılaştırılması

	Echinococcosis indirekt hemaglutinasyon testi		Toplam n (%)	χ^2	P
	Negatif n (%)	Pozitif n (%)			
Kadın	25 (64.1)	23 (63.9)	48 (64.0)	<.001	.98
Erkek	14 (35.9)	13 (36.1)	27 (36.0)		
Toplam	39 (100.0)	36 (100.0)	75 (100.0)		
	İmmunokromatografik test		Toplam n (%)	χ^2	P
	Negatif n (%)	Pozitif n (%)			
Kadın	27 (65.9)	21 (61.8)	48 (64.0)	.135	.71
Erkek	14 (34.1)	13 (38.2)	27 (36.0)		
Toplam	41 (100.0)	34 (100.0)	75 (100.0)		

Çalışmamızda KE ön tanısı ile gönderilmiş olan hastalara ait serum örnekleri iki farklı yöntemle incelenmiştir. Çalışmamız kapsamına alınan hastalardan 9'u karın ağrısı şikayetiyle hastanemize başvurmuş olup 23 hasta ise karaciğer şikayetleri, öksürük ve USG'de karaciğerde kist görülmesi nedenleri ile laboratuvara gönderilmiştir. Tatar ve ark.'ları⁽¹¹⁾ tarafından yapılan çalışmada KE'nin çoğunlukla karaciğerde yerleşim gösterdiği, akciğer yerleşimli hastalarda ise en fazla görülen belirtinin öksürük olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Ağaçfidan ve ark.'ları⁽¹²⁾ tarafından yapılan bir başka çalışmada da KE'nin en çok karaciğerde yerleştiği belirtilmiştir. Yine yapılan başka çalışmalarda kistin başta karaciğer olmak üzere kalp, akciğer, beyin, böbrek, dalak ve kemik gibi vücudun pek çok doku ve organında yerleşim gösterdiği belirtilmiştir^(13,14). Etkin genellikle karaciğerde, bilhassa da sağ lopta tutulum göstermektedir. Nadiren yerleştiği akciğer ve diğer organlarda ise belirtiler kistin yerleştiği doku, organ ve yere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Çalışmamızda *Echinococcus* IHA yöntemiyle pozitif saptanan hastaların %36.1'i erkek, %63.9'u kadın, ICT yöntemiyle pozitif saptanan hastaların %61.8'i kadın, %38.2'si erkek olup cinsiyet dağılımı açısından farkın anlamlı olmadığı görülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuçla benzer şekilde Karaman ve ark.⁽¹⁵⁾ tarafından Kars ili ve çevresinde gerçekleştirilen çalışmada KE pozitifliği ile cinsiyet arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir. Kılıç ve ark.⁽¹⁶⁾ tarafından yapılan bir başka çalışmada da yine çalışmamızdan elde edilen bulgularla uyumlu şekilde cinsiyet ile KE pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır.

Echinococcus granulosus'un yaşam döngüsüne bakılacak olursa, ara konağın koyun ve son konak olan köpeklerin yaşam alanının kırsal bölgeler olması sebebiyle kırsal bölgelerin hastalık açısından daha uygun ortamlar olduğu düşünülebilir. Ancak, çalışmamızda IHA yöntemiyle pozitif saptanan hastaların %44.44'ü kırsal, %55.56'sı kentsel kesimlerden gelen hastalardan oluşmakta, yine ICT yöntemiyle pozitif saptanan hastaların %44.11'i kırsal, %55.89'u kentsel kesimlerden gelen hastaları oluşturmaktaydı. Çalışmamızla benzer şekilde Tatar ve ark.'nın⁽¹¹⁾ yapmış oldukları çalışmada da kentsel

kesimden gelen hastalarda KE pozitifliğinin kırsal kesimlerden gelenlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiş, bu durumun kırsaldan kentsel göçe bağlı olabileceği ifade edilmiştir. Bunun yanında Çakan ve ark.⁽¹⁷⁾ tarafından yapılan çalışmada, kırsal kesimden gelen hastalarda KE pozitifliği oranının kentsel kesimlerden gelenlere kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda IHA yöntemiyle pozitif olarak bulunan 39 hastadan ikisi (%5.6) ICT yöntemiyle negatif saptanmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda IHA yönteminin yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Koç ve ark.⁽¹⁸⁾ tarafından yapılan çalışmada IHA testinin duyarlılığı %61-96, özgüllüğü %90-100 arasında bildirilmiştir. Eşgin ve ark.⁽¹⁹⁾, 85 hastanın serum örneğiyle yaptıkları çalışmalarında IHA yönteminin pozitiflik oranının %78.3 olduğunu bildirmişlerdir. Njeruh ve ark.⁽²⁰⁾ Kenya'da yapmış oldukları çalışmada, kist hidatik sıvısını antijen olarak kullanmışlar ve bu antijen ile yapılan IHA yönteminin duyarlılığını ve özgüllüğünü yüksek bulmuşlardır.

İmmünokromatografik kart testleri ise, düşük maliyeti ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle dünyada yaygın olarak kullanılan testlerdir. Testte kullanılan nanopartiküller sayesinde analiz sonucu gözle görülebilmekte ve ek bir cihaza gerek duyulmamaktadır. Bu testler genellikle kalitatif olarak kullanılır. Testlerde yüksek seçiciliğe sahip antijen ve antikorlar kullanıldığından, doğruluk oranları genellikle yüksektir⁽²¹⁾. Ancak testte kullanılan antijen ve malzemelerin özellikleri, testin duyarlılığını etkileyebilir. Çalışmamızda iki hastanın ICT yöntemiyle negatif bulunmasının, kitin duyarlılığı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Echinococcus granulosus'un yol açtığı KE'de klinik bulguların tanı koymadaki yetersizliği, radyolojik yöntemler ve serolojik testlere eğilimi artırmıştır. Radyolojik yöntemlerin, kistin yerleşimi ve boyutuna ilişkin bilgi vermesine karşın, kistin benzer kistik oluşumlardan ayrımında ve tedavi takibinde yetersiz kalması, enfeksiyon varlığı şüphesi bulunan olgularda radyolojik bulgulara ilaveten hastalığa özgü antikorları tespit eden serolojik tanı yöntemlerinin kullanımını zorunlu kılmıştır⁽¹⁾.

IHA yönteminin kolay uygulanabilir ve değerlendirilebilir olması gibi özelliklerinin yanı sıra maliyetinin düşük olması, sonuç verme süresinin kısa olması gibi önemli avantajları, KE tanısında en fazla kullanılan yöntemlerden biri olmasına neden olmuştur⁽²²⁾.

Bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olup kullanılan IHA ve ICT sonuçları birbirine yakın bulunmuştur. Fakat testlerin etkinliğinin saptanabilmesi için sağlıklı kontrol ve diğer paraziter enfeksiyona sahip hastaların serumları da dahil edilerek daha geniş çaplı çalışmalar planlanması gerekmektedir.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Gaziantep Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (10.10.2018 tarih ve 2018/269 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Gaziantep University, Clinical Research Ethics Committee (10.10.2018; 2018/269).

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Güreşer AS, Özcan O, Özünel L, Boyacıoğlu Zİ, Taylan Özkan A. Çorum'da kistik ekinokokkoz ön tanısı ile başvuran hastaların radyolojik, biyokimyasal ve serolojik analizlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2015;49(2):231-9. <https://doi.org/10.5578/mb.8656>
2. Craig PS, McManus DP, Lightowler MW, et al. Prevention and control of cystic echinococcosis. Lancet Infect Dis. 2007;7(6):385-94. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70134-2)
3. Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. Exp Parasitol. 2008;119(4):439-46. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016>
4. Şenlik B, Diker Aİ. Echinococ'ların Taksonomisi ve Morfolojisi. Altıntaş N, Tınar R, Çoker A, editörler. Echinococcosis. İzmir: Hidatidoloji Derneği Yayın No:1; 2004:13-29.
5. Akgün S, Sayiner HS, Karşılıgil T. Kistik ekinokokkoz'un serolojik tanısında indirekt hemagglütinasyon, indirekt floresan antikor ve enzim immuno assay testlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi. J Contemp Med. 2018;8(1):14-9. <https://doi.org/10.16899/gopctd.305543>
6. Miman Ö, Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. İstanbul Tıp Kitapevleri; 2018:241-50.
7. Kilimcioğlu A, Ok ÜZ. İnsanda *Echinococcus* Türlerinin Epidemiyolojileri, Coğrafi Yaygınlık ve Türkiye'deki Durum. Altıntaş N, Tınar R, Çoker A, editörler. Echinococcosis. İzmir: Hidatidoloji Derneği Yayın No:1; 2004:129-35.
8. Acıöz M. Muş ve yöresinde *Echinococcus granulosus* yaygınlığının PCR yöntemi ile araştırılması [Doktora Tezi]. Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı, 2008.
9. Sebit S, Tunc H, Gorur R, et al. The evaluation of 13 patients with intrathoracic extrapulmonary hydatidosis. J Int Med Res. 2005;33(2):215-21. <https://doi.org/10.1177/147323000503300209>
10. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:22, Met Basım, İzmir; 2007.
11. Tatar D, Yılmaz Güneş E, Berktaş Ö, Perim G. Akciğer kist hidatiki tanılı çocuk olgularımız. Akciğer Arşivi. 2003;4:31-5.
12. Ağaçfidan A, Badur S, Hazar H, Emre A, Çetin ET. Kist hidatik tanısında indirekt hemagglütinasyon ve enzim immünessey testlerinin karşılaştırılması. Klimik Derg. 1992;5(2):43-5.
13. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Patolojisi. İnsanın ökaryonlu parazitleri ve bunlarla oluşan hastalıkları. 5. baskı. İstanbul, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları; 1995:411-53.
14. Kaypmaz A. Hidatik kist: Epidemiyoloji, bulaşma ve korunma yolları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi, No: 28; 2002;285-99.
15. Karaman Ü, Miman Ö, Kara M, Gıcık Y, Aycan ÖM, Atambay M. Kars bölgesinde hidatik kist prevalansı. Türkiye Parazit Derg. 2005;29(4):238-40.
16. Kılıç S, Babür C, Taylan Özkan A. Kist hidatik ön tanılı olgularda indirekt hemagglütinasyon ve ELISA yöntemleri ile alınan sonuçların karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2007;41(4):571-7.

17. Çakan A, Çağrı U, Veral A, Bilkay Ö. Results of the surgical treatment of pulmonary hydatidosis in Ege University Medical Faculty. *Türkiye Ekopatol Derg.* 2001;7:7-12.
18. Koç NA, Kılıç H, Sözüer E, Taheri JD. Kist hidatik tanılı olgularda indirekt hemaglütinasyon yönteminin önemi ve seropozitiflik oranı. *Türkiye Parazitolo Derg.* 1996;20:57-60.
19. Eşgin M, Aktaş M, Coşkun Ş. İndirekt hemaglütinasyon testi (IHA) yöntemi ile kistik ekinokokoz şüpheli hastaların serumlarında antikor varlığının araştırılması. *Türkiye Parazitolo Derg.* 2007;31(4):283-7.
20. Njeruh FM, Gatuma JM, Okela GB, Tumbon-Oeri AG. Diagnosis of human hydatid disease in surgically confirmed cases by the use of the indirect haemagglutination test based on a termo-stable lipoprotein and unfractionated hydatid cyst fluid. *Ann Trop Med Parasitol.* 1989;83(3):299-303. <https://doi.org/10.1080/00034983.1989.11812348>
21. Akata I, Bakırcı S, Dereli D, Küçüküven E, Yılmaz İ, Kaya E. İmmünokromatografik kart testlerin çalışma prensibi ve üretim teknikleri. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi.* 2014;16(3):45-53.
22. Yazar S. Cystic Echinococcosis (CE)'in tanısında SDS-PAGE ve Western Blot yönteminin diğer serolojik tanı yöntemleri ile karşılaştırılması [Doktora Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1998.

Yoğun Bakım Ünitelerinden Beş Yıllık Bir Analiz: Kan Kültürlerinden Soyutlanan *Escherichia coli* Antibiyotik Direnci Ne Durumda?

A Five-Year Analysis from Intensive Care Units: What is the Current Situation of Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Blood Cultures?

İsmail Selçuk Aygar[✉], Zehra Leyla Yapalak[✉], Ayşe Korkmaz Akyüz[✉], Kübra Atılan[✉], Kemal Tekin[✉]

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Atıf/Cite as: Aygar İS, Yapalak ZL, Korkmaz Akyüz A, Atılan K, Tekin K. Yoğun bakım ünitelerinden beş yıllık bir analiz: Kan kültürlerinden soyutlanan *Escherichia coli* antibiyotik direnci ne durumda? Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):265-271.

Öz

Amaç: Yoğun bakım üniteleri (YBÜ) özellikli cihazlar ve tıbbi desteklerle kritik hastaların takip edildiği merkezlerdir. Yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda gelişen hastane enfeksiyonları morbidite ve mortalite oranların arttırmasının yanında ciddi mali kayıplara neden olması nedeniyle de küresel bir sorun olarak görülmektedir. YBÜ’de en sık izole edilen patojenlerin arasında *Escherichia coli* gibi Enterobacteriaceae türlerinin olduğu bilinmektedir. Bu bakteriler arasında da *E. coli*’nin oransal baskınlığı dikkat çekicidir.

Yöntem: Ocak 2018 - Aralık 2022 yılları arasında tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarımıza yoğun bakım kliniklerinden gelen 219 hastaya ait kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatları dahil edildi ve bu izolatlara ait veriler retrospektif olarak değerlendirildi.

Bulgular: YBÜ’lerinde 2018-2022 yılları arasında yatan ve kan kültürlerinde üreme tespit edilen 1976 hastanın 219 tanesinde *E. coli* üremesi tespit edildi. *E. coli* izole edilen hastaların ise %48’i kadın, % 52’si erkek ve yaş ortalamaları ise 70.42 (19-98) olarak hesaplandı. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç oranları incelendiğinde tüm yıllar içerisinde en yüksek oran ampisilinde tespit edildi.

Sonuç: Bazı yıllarda direncin artış eğiliminde olduğu, sonraki yıllarda ise önce azalışa geçip sonra tekrardan yükselişe geçtiği izlenmiştir. Bu durum, bakteriyemilerin hastane kaynaklı dirençli suşların neden olduğu salgınlardan kaynaklandığını; enfeksiyon kontrolü ve etkin temizlik gibi gerekli önlemleri olarak bu salgınlara mücadele edersek direncin yayılımını kontrol altına alabileceğimizi; ayrıca her hastanenin akılcı antibiyotik kullanım politikalarını belirlemek için kendi verilerini oluşturmaları gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, klinisyenler ile tıbbi mikrobiyologların işbirliği içinde çalışması da büyük önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, *Escherichia coli*, Kan Kültürü

ABSTRACT

Objective: Intensive care units (ICUs) are centers where critically patients are followed up with specialized devices and medical supports. Nosocomial infections in patients followed up in intensive care units are seen as a global problem due to the increase in morbidity and mortality rates, as well as causing serious financial losses. It is known that Enterobacteriaceae species, such as *Escherichia coli*, are among the most frequently isolated pathogens in ICUs. Among these bacteria, the proportional dominance of *E. coli* is remarkable.

Methods: A retrospective analysis was done using the *E. coli* isolates obtained from the blood cultures of 219 patients referred from the intensive care units to laboratory between January 2018 and December 2022.

Results: *E. coli* growth was detected in 219 of 1976 patients hospitalized in ICUs between 2018-2022. *E. coli* isolated patients were 48% female and 52% male, and the mean age was 70.42(19-98). Among the antibiotic resistance rates of *E. coli* isolates, the highest rate was found in ampicillin for all years.

Conclusion: It was observed that antibiotic resistance tended to increase in some years, followed by declines and elevations. This indicates that bacteremia is caused by the outbreaks due to hospital-acquired resistant strains. It is obvious that if we could fight against these epidemics by taking necessary precautions, such as infection control and effective cleaning, we could indeed control the spread of the resistance. Each hospital should develop its own data to determine rational antibiotic use policies, and clinicians should cooperate with medical microbiologists in these circumstances.

Keywords: Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, Blood Culture

Alındığı tarih / Received:

29.06.2023 / 29.June.2023

Kabul tarihi / Accepted:

14.09.2023 / 14.September.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

İ. S. Aygar 0000-0002-3344-3508

Z. L. Yapalak 0000-0003-3183-019X

A. Korkmaz Akyüz 0000-0001-6845-9078

K. Atılan 0000-0003-3581-3389

K. Tekin 0000-0002-6610-6540

✉ drisa1986@hotmail.com

GİRİŞ

Yoğun bakım üniteleri (YBÜ) özellikli cihazlar ve tıbbi desteklerle kritik hastaların takip edildiği merkezlerdir⁽¹⁾. Yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda gelişen enfeksiyonlar morbidite ve mortalite oranları arttırmasının yanında ciddi mali kayıplara neden olması nedeniyle global bir sorun olarak görülmektedir^(2,3). Enfeksiyon oranlarındaki artışın ve tedavideki antimikrobiyal direncin nedeni olarak YBÜ'deki hastalara uygulanan invaziv uygulamalar, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yoğun kullanımı ve hastane yatış sürelerinin uzaması gibi nedenler gösterilebilir^(1,4).

YBÜ'de en sık izole edilen patojenlerin arasında *Escherichia coli* gibi Enterobacterales türlerinin olduğu bilinmektedir⁽³⁻⁵⁾. Çok merkezli yapılan bir çalışmada YBÜ hastalarında tespit edilen enfeksiyonlarda son 10 yılda çoklu ilaca dirençli Gram negatif bakteri oranlarının arttığı gösterilmiştir^(2,6). Bu bakteriler arasında da *E. coli*'nin oransal baskınlığı dikkat çekicidir. *E. coli*'nin bir çok sero tipinin herhangi bir hastalığa yol açmazken bazı serotipleri ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır⁽⁷⁾. Serotiplerin büyük bölümü bağırsaklarda kommensal olarak bulunur ve miktarları dışkıda 10^6 - 10^9 KOB/g kadardır. Bağırsaklarda flora bakterisi olarak bulunan Enterobacterales ailesine üye diğer bakterilerle birlikte enfektif mikroorganizmalara karşı immün sistemin aktivitelerinde yer alırlar. Çoğu bireyde apatojen olarak normal bağırsak florasında yer alan *E. coli*, bağışıklığı baskılanmış konaklarda ya da çeşitli mekanizmalarla gastrointestinal bariyeri aşarak virulan suşların yanında enfeksiyonlara neden olabilir⁽⁸⁾. Bu enfeksiyonlar kan dolaşımı, solunum yolu, idrar yolu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları olarak sıralanabilir^(4,5).

Etkenlerin antibiyotik direnç surveyansının yapılması ve etkin enfeksiyon kontrol yöntemleri uygulamaları dirençli izolatların kontrolünde büyük yer tutmaktadır^(1,3,4). Farklı merkezlerin farklı antibiyotik direnç profilleri olabileceği düşünüldüğünde, antibiyotik direncinin önlenmesi ve varsa kontrol altında tutulması için her merkezin kendi antibiyotik

direnç profilini çıkararak takip etmesi çok önemlidir^(2,3,5).

Çalışmamızda hastanemiz yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastaların kan kültürlerinden soyutlanan *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi ve antibiyotik direnç surveyansının yapılması sonucunda elde ettiğimiz verileri irdeleyip literatüre katkıda bulunarak klinisyenlerin doğru antibiyotik kullanım stratejilerini geliştirmelerini amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (16.05.2023 tarih ve 2023/175 sayı) onaylanmıştır.

Ocak 2018 - Aralık 2022 yılları arasında tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarımıza COVID-19 dışı yoğun bakım kliniklerinden gelen 219 hastaya ait kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatları dahil edildi ve bu izolatlara ait veriler retrospektif olarak değerlendirildi. Hastalara ait tekrarlayan üremelerde çalışmaya sadece ilk izolat dahil edildi. Yıllara göre ayırım yapılırken izolatların ilk üreme zamanı dikkate alındı.

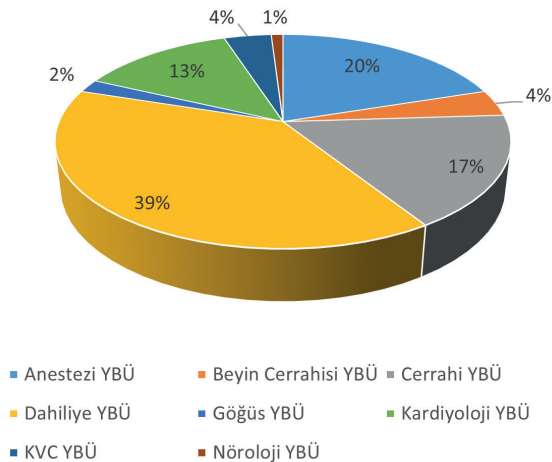
Kan kültür şişesine alınan numuneler BACTEC 9120 (Becton Dickinson, ABD) otomatik kan kültürü cihazında beş gün inkübasyona bırakıldı. Pozitif sinyal veren şişelerden Gram boyama yapıldı, %5 koyun koyun kanlı agar ve Eosin Methylene Blue (EMB) agara ekimler yapılarak 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Üreme olan plaklara yapılan gram boyamada Gram negatif basil görünümü tespit edilen bakterilerin identifikasyonu "Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry" (MALDI-TOF MS, Bruker, Germany) ile yapıldı. Antibiyotik duyarlılıkları ise VITEK-2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapıldı, sonuçlar EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standartlarına göre değerlendirildi⁽⁹⁾. Çalışma Helsinki Deklarasyonu'na uyumlu şekilde yürütüldü.

İstatistiksel Analiz: Veriler SPSS (Ver 22.0, ABD) paket programına aktarılarak bilgisayar ortamında veri kontrolü ve analizler yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede tanımlayıcı değerler ortalama ve (%) yüzde olarak verilmiştir.

BULGULAR

Yoğun bakım ünitelerinde 2018-2022 yılları arasında yatan ve kan kültürlerinde üreme tespit edilen 1976 hastanın takip edildikleri servisler Şekil 1’de gösterilmiştir.

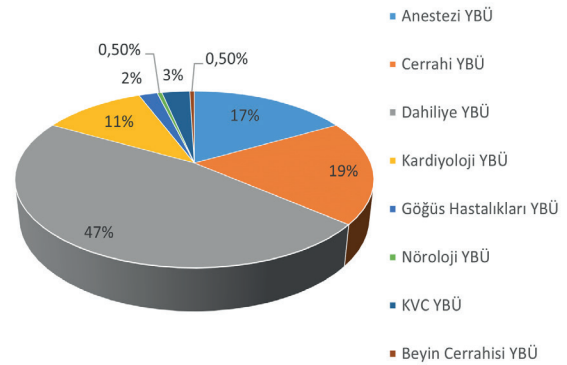
Bu hastaların %55’i erkek, %45’i kadındı. Yaş ortalamaları 68.3 (0-100) olarak hesaplandı. Toplam 1976 hastada çoklu üremelerle birlikte 3851 mikroorganizma izole edildi. Bunlardan 2235 (%58)’i Gram pozitif bakteri, 1570 (%48.5)’i Gram negatif bakteri, 46 (%1.5)’si ise mayaydı. Gram negatif bakterilerin tür dağılımı Tablo 1’de özetlenmiştir (Tablo 1).



Şekil 1. Kan kültürlerinde üreme olan YBÜ hastalarının servislere göre dağılımı

Tablo 1. Gram negatif bakterilerin tür dağılımı

Bakteri (N=1570)	Sayı n (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	461 (29.5)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	415 (26.5)
<i>Escherichia coli</i>	219 (14.0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	110 (7.0)
<i>Enterobacter spp.</i>	35 (2.0)
Diğer	330 (21.0)



Şekil 2. *Escherichia coli* izole edilen hastaların yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı

YBÜ’den gelen kan kültürlerinden *E. coli* izole edilen hastaların ise takip edildikleri servisler Dahiliye Yoğun Bakım (%47), Cerrahi Yoğun Bakım (%19), Anestezi Yoğun Bakım (%17), Kardiyoloji Yoğun Bakım (%11), Kalp ve Damar Cerrahisi Yoğun Bakım (%3), Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım (%2), Nöroloji Yoğun Bakım (%0.5) ve Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım (%0.5) şeklindeydi (Şekil 2).

Escherichia coli izole edilen hastaların ise %48’i kadın, % 52’si erkek ve yaş ortalamaları ise 70.4 (19-98) olarak hesaplandı. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç oranları incelendiğinde tüm yıllar içerisinde en yüksek oran ampicilinde tespit edildi. Diğer antibiyotiklere ait direnç oranları ve yıllara göre dağılımı Tablo 2’de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

YBÜ’de takip edilen hastalarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması, invaziv girişimlerin uygulanması ve uzamış yatış süreleri gibi nedenlerden dolayı çeşitli enfeksiyonların gelişimi kolaylaşmakta bu nedenle de mortalite ve morbiditede artış görülmektedir^(3,10). Enfeksiyona neden olan izolatların tür dağılımı genel olarak enfeksiyon gelişen sisteme göre farklılık gösterse de çoğunlukla Gram negatif bakteriler başı çekmektedir⁽¹¹⁾. İngiltere’de yapılan çok merkezli bir süveyans çalışmasında kan örneklerinde Gram negatif bakterilerin ilk sıraya yükseldiği, geçtiğimiz son 20 yıl içerisinde Gram pozitif bakterilerin ve mantarların yerini aldığı gösterilmiştir⁽¹²⁾. Son yıllarda Gram negatif

Tablo 2. *Escherichia coli* izolatlarının yıllara göre antibiyotik direnç oranlarının dağılımı (%)

Antibiyotik	Yıl				
	2018 (n=43)	2019 (n=42)	2020 (n=45)	2021 (n=48)	2022 (n=41)
Ampisilin	88.37	73.81	80	83.33	75.61
Piperasilin-Tazobaktam	23.26	21.43	11.11	14.58	24.39
Sefepim	69.77	64.29	64.45	66.67	53.66
Seftriakson	72.09	66.67	55.56	77.08	65.85
Sefuroksim	81.40	69.05	66.67	62.50	70.73
Sefoksitin	27.91	23.81	20	10.42	24.39
Seftazidim	62.79	66.67	57.78	58.33	70.73
İmipenem	4.65	7.14	15.54	4.17	7.9
Meropenem	4.65	7.14	8.88	4.17	4.88
Ertapenem	9.30	7.14	13.33	4.17	9.76
Siprofloksasin	67.44	61.91	42.22	64.58	58.54
Amikasin	34.88	7.14	6.66	4.17	9.76
Gentamisin	20.93	28.57	11.11	31.25	31.71
Tigesiklin	0	0	0	4.17	7.32
Trimetoprim-Sülfametoksazol	36.65	42.38	40	41.67	51.22

bakterilerin bakteriyemiye neden olmalarındaki artışın nedeni olarak bu bakterilerde gelişen çoklu ilaçlara karşı gelişen dirençler, bu dirençlere rağmen yeni ve etkili antibiyotik keşfedilmemesi, pulmoner ve üriner sistem enfeksiyonlarına sekonder olarak bakteriyeminin gelişmesi ve *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* prevalansının hastane enfeksiyonu kaynaklı artışı sayılabilir⁽¹³⁾.

2012 yılında çok merkezli yapılan başka bir çalışmada YBÜ'de takip edilen hastalara ait kan numunelerinden en sık izole edilen bakteriler sırasıyla *Acinetobacter spp.* (%12.2), *Klebsiella spp.* (%11.9) ve *Pseudomonas spp.* (%11.4) olarak tespit edilmiştir⁽¹⁴⁾. Benzer sonuçların elde edildiği Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada ise bakteriyemiye neden olan etkenler; *A. baumannii* (%21.5) ve *K. pneumoniae* (%18) olarak rapor edilmiştir⁽¹⁵⁾.

Daha yakın tarihli yapılan bir çalışmada ise bakteriyemiye neden olan etkenler arasında *E. coli* (%23)'nin ilk sırada yer aldığı görülmüştür⁽¹²⁾. Kanada'da 2015 yılında yapılan bir çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde bakteriyemi nedeniyle takip

edilen hastalarda yine en sık saptanan etkenin *E. coli* (%21) olduğu saptanmıştır⁽¹⁶⁾. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise yoğun bakım ünitelerinde bakteriyemiye neden olan Gram negatif bakteriler sırasıyla *A. baumannii* (%31), *K. pneumoniae* (%27), *E. coli* (%24), *P. aeruginosa* (%9) olarak bulunmuştur⁽¹⁷⁾. Ancak 2020 yılında Türkiye'nin farklı bölgelerinde yer alan 120 laboratuvarın katıldığı ve %90'dan fazlasının kan örneklerinin oluşturduğu WHO CAESAR (Central Asian And Eastern European Surveillance Of Antimicrobial Resistance) raporuna göre en fazla izole edilen etkenler sırasıyla *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* şeklinde raporlanmıştır⁽¹⁸⁾. WHO CAESAR raporundan farklı olarak bizim çalışmamızda ilk sırada *K. pneumoniae* (%29.5) yer alırken onu, *A. baumannii* (%26.5) *E. coli* (%14), *P. aeruginosa* (%7) ve *Enterobacter spp.* (%2) izlemiştir.

Diğer servislerden izole edilen etkenlerle kıyaslandıklarında, YBÜ'de takip edilen hastalardan soyutlanan izolatların ortak özellikleri daha yüksek oranda antibiyotik direncine sahip olmalarıdır. Bu nedenle kullanılan geniş spektrumlu antibiyotik oranı artmakta direncin hem sebebi hem de sonucu

olarak bu durum da antibiyotik direnciyle mücadele ederken yeni dirençlerin gelişmesine yol açarak bir kısır döngüye sebep olmaktadır^(11,19). Son 30 yıl içerisinde Gram negatif bakterilerin etken olarak izole edilmelerindeki artışın yanı sıra direnç oranlarındaki artış da dikkat çekicidir⁽²⁰⁾. Ampirik tedavide siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazolun yaygın olarak kullanılması bu antibiyotiklere karşı direnç artışından sorumlu tutulmaktadır^(21,22). Siprofloksasin direnci (%23.8), aminopenisilin direncini (%57.1) takip ederek Avrupa'da ikinci en yüksek direnç oranına sahip antibiyotik olarak karşımıza çıkmaktadır⁽²³⁾. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak ampsilin, siprofloksasin, sefalosporinler ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi tedavide sıklıkla kullanılan ajanlara karşı yüksek direnç oranları saptanmıştır⁽²⁴⁻²⁷⁾. Çin'de yapılan 10 yıllık verilerin retropektif olarak incelendiği bir çalışmada yıllar içerisinde kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* suşlarının sefalosporin ve aztreonam direnç oranlarında düşüş olduğu gösterilmiştir⁽²⁷⁾. Yine başka merkezde yapılan 1998-2017 yılları arasındaki kan kültür sonuçlarının incelendiği başka bir çalışmada *E. coli* suşlarının birinci kuşak sefazolin, ikinci kuşak sefazolin ve sefuroksim, üçüncü kuşak sefazolin, sefotaksim ve seftazidim, dördüncü kuşak sefazolin, sefepim ve aztreonam direnç oranlarında yıllar içerisinde azaldığı tespit edilmiştir⁽²⁸⁾. Bizim çalışmamızda da direnç oranlarında yıllar içerisindeki değişim izlendiğinde ise bu yüksek direnç oranına sahip antibiyotiklerde ampsilin, siprofloksasin ve sefalosporinlerde düşüş izlenirken trimetoprim-sülfametoksazolde ise artış göze çarpmıştır.

GSBL pozitif bakterilerin tedavisinde kullanılan ilk ajanlar karbapenemlerdir ancak takip edilen hastalardaki uygunsuz kullanımları nedeniyle karbapenemlere karşı da direncin gelişmesi önemli sorunlardan biri haline gelmiştir^(29,30). 2013-2017 yılları arasında Türkiye'de yapılan bir çalışmada YBÜ'de izole edilen *E. coli* suşlarında karbapenem direnci %1.4 olarak tespit edilmiştir⁽³¹⁾. 2013 yılında bu oran %0.5 iken 2017 yılında %2.3 olarak bulunmuştur⁽³¹⁾. Başka bir çalışmada ise 2014-2017 yılları arasındaki direnç durumu irdelenmiş, 2014 yılında %4.1 olan *E. coli* suşlarının karbapenem direnci 2017 yılında %7.5 olarak tespit edilmiştir⁽³²⁾. Yurtdışında yapılan *E. coli* karbapenem direnç oranlarının yıllar içerisindeki

değişiminin incelendiği bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hasta grubunda direnç oranının artış eğiliminde olduğu ancak yoğun bakım harici servislerde takip edilen hasta grubunun direnç oranlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir⁽²⁸⁾. Bizim çalışmamızda ise karbapenem direnci 2018 yılında %6.2 olarak bulunurken 2022 yılında ise oran %7.3'dür. Bizim çalışmamız ve literatürdeki diğer çalışmalar değerlendirildiğinde özellikle yoğun bakım ünitelerinde karbapenem direnç oranlarının riskli düzeylere geldiği, eğer gerekli önlemler alınmazsa bu oranların takip eden yıllarda artışa devam edeceği açıktır.

Tedaviye dirençli enterik patojenlerin tedavisinde kullanılan bir başka antibiyotik ise antipsödomonal bir penisilin olan piperasilin-tazobaktam'dır. Tıpkı karbapenemlerde olduğu gibi piperasilin-tazobaktamın da uygunsuz kullanımı Enterobacteriaceae'da dirence neden olarak tedavideki başarıyı düşürmüştür⁽³³⁾. Aydemir ve ark.'larının⁽³³⁾ yaptığı bir çalışmada piperasilin tazobaktam direnci *E. coli* izolatları için %44.6 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda bu oran bu tablonun aksine 2018 yılı için %23.26 olarak bulunmuşken 2022 yılında ise %24.39 gibi görece düşük oranda tespit edilmiştir. Bu sonuç bize direnç oranlarının hastaneler arasında değişiklik gösterebileceğini bu nedenle her hastanenin kendi antibiyotik direnç profilini çıkararak takip etmesi gerektiğinin direnç sorunuyla mücadelede ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızdaki diğer bir önemli husus da antibiyotik direncinin yıllar içindeki değişken seyridir. Bazı yıllarda direncin artış eğiliminde olduğu, sonraki yıllarda ise önce azalışa geçip sonra tekrardan yükselişe geçtiği izlenmiştir. Bu durumun bakteriyemilerin hastane kaynaklı dirençli suşların neden olduğu salgınlardan kaynaklandığını, enfeksiyon kontrolü ve etkin temizlik gibi gerekli önlemleri alarak bu salgınlara mücadele edersek direncin yayılımını kontrol altına alabileceğimizi, tüm bunlarla birlikte sağlık merkezlerinin kendi verilerini çıkartmasının akılcı antibiyotik kullanım politikaları doğrultusunda alınacak önlemler için hayati bir önem taşıdığını ayrıca gerek klinik gerekse laboratuvar uzmanlarının yakın işbirliği içinde çalışması gerektiğini düşünmekteyiz.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (16.05.2023 tarih ve 2023/175 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of University of Health Sciences, Gülhane Scientific Research Ethics Committee (05.16.2023; 2023/175).

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

- Araç E, Kaya Ş, Parlak, E, et al. Yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyonların değerlendirilmesi: Çok merkezli nokta prevalans çalışması. Mikrobiyol Bul. 2019;53:364-73. <https://doi.org/10.5578/mb.68665>
- Yetkin F, Yakupogullari Y, Kuzucu C, et al. Pathogens of intensive care unit-acquired infections and their antimicrobial resistance: A 9-year analysis of data from a university hospital. Jundishapur J Microbiol. 2018;11(10):67716. <https://doi.org/10.5812/jjm.67716>
- Beştepe Dursun Z, Aydın S, Çelik İ. Yoğun bakım ünitesinde bakteremi nedeni olan mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. Flora. 2019;24(3):183-9. <https://doi.org/10.5578/flora.67603>
- Uc-Cachón AH, Gracida-Osorno C, Luna-Chi IG, et al. High prevalence of antimicrobial resistance among Gram-negative isolated bacilli in intensive care units at a tertiary-care hospital in Yucatán Mexico. Medicina (Kaunas). 2019;55(9):588. <https://doi.org/10.3390/medicina55090588>
- Ibrahim ME. High antimicrobial resistant rates among Gram-negative pathogens in intensive care units a retrospective study at a tertiary care hospital in Southwest Saudi Arabia. Saudi Med J. 2018;39(10):1035-43. <https://doi.org/10.15537/smj.2018.10.22944>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet). ECDC. [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AMR-surveillance-Europe-2016.pdf] (Erişim tarihi: 21.08.2023).
- Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara: Pozitif Matbaacılık; 2007.
- Meng J, Schroeder CM. *Escherichia coli* in Foodborne Diseases. Simjee S, editor. New Jersey Humana Press; 2007.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, valid from 2022-01-01. EUCAST. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf] (Erişim tarihi: 21.08.2023).
- Şen Taş S, Kahveci K. Uzun süreli yoğun bakım ünitesi ve palyatif bakım merkezinde hastane enfeksiyonlarının sürveyansı; 3 yıllık analiz. J Contemp Med. 2018;8(1):55-9. <https://doi.org/10.16899/gopctd.353490>
- Barış A, Bulut ME, Öncül A, Bayraktar B. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara ait klinik izolatların tür dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. J Turk Soc Intens Care. 2017;15(1):21-7. <https://doi.org/10.4274/tybdd.55707>
- Wilson J, Elgohari S, Livermore DM, et al. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004-2008. Clin Microbiol Infect. 2011;17(3):451-8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03262.x>
- Marra AR, Camargo LFA, Pignatari AC, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. J Clin Microbiol. 2011;49(5):1866-71. <https://doi.org/10.1128/JCM.00376-11>
- Tabah A, Koulenti D, Laupland K, et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EURO-BACT International Cohort Study. Intensive Care Med. 2012;38(12):1930-45. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2695-9>
- Mathur P, Varghese P, Tak V, et al. Epidemiology of blood stream infections at a level-1 trauma care center of India. J Lab Physicians. 2014;6(1):22-7. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.129086>
- Sligl WI, Dragan T, Smith SW. Nosocomial Gram negative bacteremia in intensive care: Epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. Int J Infect Dis. 2015;37(1):129-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.024>
- Ergönül Ö, Aydın M, Azap A, et al. Healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. J Hosp Infect. 2016;94(4):381-5. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.012>
- World Health Organization (WHO). Central Asian and European surveillance of antimicrobial resistance: annual report 2020. WHO. [https://iris.who.int/handle/10665/345873] (Erişim tarihi: 21.08.2023).

19. Emre S, Moroğlu Ç, Yıldırım T, et al. Panrezistan *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonunda kombinasyon antibiyotik tedavisi: iki olgu bildirisi. *Klinik Derg.* 2018;31(2):169-72.
<https://doi.org/10.5152/kd.2018.40>
20. Kamit F, Şener D. Bir devlet hastanesi üçüncü basamak çocuk yoğun bakım ünitesinde çoklu ilaç dirençli Gram negatif enfeksiyonların değerlendirilmesi. *Pam Tıp Derg.* 2020;13(3):547-54.
<https://doi.org/10.31362/patd.689725>
21. Kot B. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. *Pol J Microbiol.* 2019;68(4):403-15.
<https://doi.org/10.33073/PJM-2019-048>
22. Bader MS, Loeb M, Leto D, Brooks AA. Treatment of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance and new antimicrobial agents. *Postgrad Med.* 2020;132(3):234-50.
<https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1680052>
23. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. ECDC. [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TQ-AC-20-001-EN-N_0.pdf] (Erişim tarihi: 21.08.2023).
24. Naldan ME, Coşkun MV, Ünal O, Kardeşin V, Vural MK. Yoğun bakım kliniklerinde yatan hastalardan izole edilen gram-negatif basillerin değerlendirilmesi. *Türk J Intens Care.* 2017;15(3):117-23.
<https://doi.org/10.4274/tybd.15238>
25. Balin ŞÖ, Denk A. Harput Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitesinde 2013-2014 yılı invaziv alet ilişkili hastane enfeksiyonlarının değerlendirilmesi. *Fırat Tıp Derg.* 2016;21(1):24-8.
26. Haïndongo EH, Ndakolo D, Hedimbi M, Vainio O, Hakanen A, Vuopio J. Antimicrobial resistance prevalence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* amongst bacteremic patients in Africa: a systematic review. *J Glob Antimicrob Resist.* 2023;32:35-43.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.11.016>
27. Liu C, Xu M, Li X, et al. Trends in antimicrobial resistance in bloodstream infections at a large tertiary-care hospital in China: a 10-year retrospective study (2010–2019). *J Glob Antimicrob Resist.* 2022;29:413-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.09.018>
28. Tian L, Zhang Z, Sun Z. Antimicrobial resistance trends in bloodstream infections at a large teaching hospital in China: a 20-year surveillance study (1998-2017). *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:86.
<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0545-z>
29. Sağmak-Tartar A, Özer AB, Ulu R, Akbulut A. Endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları: bir yıllık retrospektif analiz. *Klinik Derg.* 2018;31(1):56-60.
<https://doi.org/10.5152/kd.2018.14>
30. Bayraktar B, Pelit S, Bulut ME, Aktas E. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kan dolaşımı enfeksiyonlarında antibiyotik direnç oranlarının yıllar içindeki değişimi. *Med Bull Sisli Etfal Hosp.* 2019;53(1):70-5.
<https://doi.org/10.14744/semb.2018.60352>
31. Duman Y, Kuzucu C, Tekerekoglu MS, Cakil B, Yakupogullari Y, Kaysadu H. Changing trends of carbapenem resistance of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from intensive care units, inpatient services and outpatient's clinics: a five years retrospective analysis. *MedScience.* 2018;7(3):536-9.
<https://doi.org/10.5455/medscience.2018.07.8815>
32. Tümtürk A, Tezer Tekçe AY, Şanal L. Nozokomiyal enfeksiyon etkeni Gram negatif bakterilerde karbapenem direnç oranları: üçüncü basamak bir hastaneden retrospektif bir çalışma. *Ortadoğu Tıp Derg.* 2019;11(4):422-6.
<https://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.516673>
33. Aydemir Ö, Terzi HA, Şahin Özözen E, Köroğlu M, Altındış M. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında piperasilin/tazobaktam invitro etkinliği. *Online Turk Sağ Bil Dergisi.* 2019;4(2):118-27.
<https://doi.org/10.26453/otjhs.487008>

Bir Üniversite Hastanesine Başvuran Kadın Hastalarda Yüksek Riskli HPV Sıklığı ve Genotip Dağılımı Sonuçlarının 3 Yıllık Retrospektif Analizi

Retrospective Analysis of The 3-Year Outcomes of High-Risk HPV Frequency and Genotype Distribution in Female Patients Admitted to A University Hospital

Salim Yakut^{*✉}, Nesrin Gareayaghi^{**✉}, Fadile Yıldız Zeyrek^{*✉}, Arjen Ulaba^{*✉}, Mehmet Demirci^{***✉}, Akın Yiğın^{****✉}

* Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

** Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, İstanbul, Türkiye

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

**** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Atıf/Cite as: Yakut S, Gareayaghi N, Yıldız Zeyrek F, Ulaba A, Demirci M, Yiğın A. Bir üniversite hastanesine başvuran kadın hastalarda yüksek riskli hpv sıklığı ve genotip dağılımı sonuçlarının 3 yıllık retrospektif analizi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):272-277.

ÖZ

Amaç: Human papillomavirus (HPV), deri ve mukozal epitel hücrelerinde çoğalabilen küçük, çift zincirli bir DNA virüsüdür. HR-HPV genotiplerinin kalıcı enfeksiyonları, servikal kanser vakalarının %99'dan fazlasında başlıca neden olarak kabul edilmektedir. Biz de çalışmamızla, üniversite hastanemize başvuran bölgemizde yaşayan 18 yaş üstü hastalarda HPV sıklığını ve HPV16, HPV18 ve 12 diğer HR-HPV genotipinin varlığını retrospektif olarak saptamayı ve sunmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışmamıza Eylül 2017 – Nisan 2021 tarihleri arasında kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran 18 yaş üstü 685 hastadan alınan PreservCyt® solüsyonu içerisindeki servikal fırça numunesi ve pap smear sonuçları dahil edildi. HPV genotiplendirmesi Roche cobas® 4800 (Roche, İsviçre) tam otomatik sistemi kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda çalışıldı.

Bulgular: Çalışmamıza dahil edilen 685 kadın hastanın 126'sında (%18.4) HR-HPV pozitifliği bulunmuştur. HPV pozitif bulunan kadınların %4.5'unda HPV16 pozitifliği saptanırken, HPV18 pozitifliği %1.8 ve diğer 12 HR-HPV genotipi pozitifliği ise %12.1 oranında saptandı. HPV16 pozitif hastaların üçünde LSIL, ikisinde HSIL ve birinde ASC-US tipi saptanırken, HPV18 pozitif 12 hastanın sadece birinde ASC-US saptandı. Diğer yüksek risk HPV genotipini taşıyan hastalarda ise bir LSIL, bir HSIL ve dört ASC-US belirlendi.

Sonuç: Çalışmamızdan elde edilen veriler bölgemizde hastanemize başvuran kadınlarda HR-HPV pozitifliğinin dünyadaki ve ülkemizdeki bazı verilerle uyumlu olduğu, ancak genel olarak daha düşük olduğu görüldü. Genotip dağılımına bakıldığında HPV16 ve HPV18 pozitifliği yanında diğer HR-HPV genotiplerinin de olduğunu, HPV16 ve HPV18'e karşı aşı ile korunma sağlanabilecek olmasına karşın bazı HR-HPV genotiplerinin ilerleyen süreçte sorun olabileceğini bize düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: HPV, HR-HPV, genotip, Cobas 4800

ABSTRACT

Objective: Human papillomavirus (HPV) is a small, double-stranded DNA virus that can replicate in skin and in mucosal epithelial cells. Persistent infections of the HR-HPV genotypes are considered as the causative agents in more than 99% of cervical cancer cases. In our retrospective study, we aimed to determine the frequency of HPV and the presence of HPV16, HPV18 and other 12 HR-HPV genotypes in patients over the age of 18, from our region who applied to our university hospital.

Methods: Cervical brush sample in PreservCyt® solution and pap smear results of 685 patients over the age of 18 who applied to the gynecology and obstetrics outpatient clinic between September 2017 and April 2021, were included in our study. HPV genotyping was performed using the Roche Cobas® 4800 (Roche, Switzerland) fully automatic system in accordance with the manufacturer's instructions.

Results: HPV was identified in 126 (18.4%) of 685 female patients included in our study. While HPV16 was detected in 4.5% of HR-HPV positive women, HPV18 was found in 1.8% and 12 other HR-HPV genotypes was found in 12.1%. While LSIL was detected in three, HSIL in two, and ASC-US in one of HPV16 positive patients, ASC-US was detected in only one of 12 HPV18 positive patients. One LSIL, one HSIL and four ASC-US were determined in patients with other high-risk HPV genotypes. As a result, the data obtained from our study showed that HR-HPV positivity in women admitted to our hospital in our region was compatible with some data

Alındığı tarih / Received:

28.07.2023 / 28.July.2023

Kabul tarihi / Accepted:

11.10.2023 / 11.October.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

S. Yakut 0000-0003-2675-6677

N. Gareayaghi 0000-0002-0812-1128

F. Yıldız Zeyrek 0000-0001-7386-9944

A. Ulaba 0000-0003-1454-8774

M. Demirci 0000-0001-9670-2426

A. Yiğın 0000-0001-9758-1697

✉ 21salimyakut21@gmail.com

in the world and in our country; however, it was relatively lower in general. Considering the genotype distribution, it led us to think that there were other HR-HPV genotypes besides HPV16 and HPV18 positivity.

Conclusion: *The data obtained from our study showed that HR-HPV positivity in women from our region admitted to our hospital was relatively compatible with some of the data in both our country and the world; however, it was relatively lower in general. Considering the genotype distribution, we think that there are other HR-HPV genotypes other than HPV16 and HPV18 positivity, and although protection against HPV16 and HPV18 can be provided by vaccination, some HR-HPV genotypes may be a problem in the future.*

Keywords: HPV, HR-HPV, cobas 4800

GİRİŞ

Human papillomavirus (HPV), deri ve mukozal epitel hücrelerinde çoğalabilen küçük, çift zincirli bir DNA virüsüdür. Şu an uluslararası HPV referans merkezi, 230 HPV alt tipi bildirmiştir⁽¹⁾. Genital HPV genotipleri kanser yapma potansiyellerine göre yüksek risk (HR) ve düşük risk (LR) gruplarına ayrılmaktadır⁽²⁾. HPV enfeksiyonları dünya çapında en yaygın cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardandır (STI) ve her iki cinsiyet içinde, cinsel olarak aktif bireylerin en az %50'sini hayatlarının bir noktasında etkiler⁽³⁾. GLOBOCAN'ın 2018 istatistiklerine göre, servikal kanserler kadınlarda en sık saptanan kanserler arasında dördüncü sırada görülmektedir. Yine bu rapora göre 2018'de, 310.000 ölüme neden olmuş ve 570.000 yeni vaka gözlenmiştir⁽⁴⁾. Servikal kanser vakalarının büyük çoğunluğu az gelişmiş ülkelerde tespit edilmektedir. Bir veya birden fazla yüksek risk (HR)-HPV genotiplerinin kalıcı enfeksiyonları, servikal kanser vakalarının %99'dan fazlasında başlıca neden olarak kabul edilmektedir⁽⁵⁾. Piyasada HPV'den korunabilmek amaçlı, ticari olarak temin edilebilen üç tane HPV aşısı bulunmaktadır. Bunlar; ikili HPV aşısı, dördümlü HPV aşısı ve dokuzlu HPV aşısıdır. Buna karşın, bu aşılarda içeriklerindeki genotipler tüm HR-HPV genotiplerini kapsamamaktadır^(6,7). HPV DNA tabanlı moleküler testler günümüzde WHO tarafından primer tarama için önerilen testlerdir. Türkiye'de 2004 yılında pap smear kullanılarak popülasyona dayalı bir HPV tarama programı başlatılmasına karşın, bu çok başarılı olamamıştır. 2014 yılında bu program tekrar dizayn edilmiş merkezi laboratuvarı primer HPV DNA ve HPV genotip tarama algoritması şeklinde yeniden oluşturulmuş ve ilk sonuçlar yayınlandığında farklı yüksek riskli (HR-HPV) tiplerinin de ülkemizdeki vakalarda sıklıkla gözlemlendiği anlaşılmıştır⁽⁸⁾. Biz de bu nedenle çalışmamızla, üniversite hastanemiz kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran bölgemizde yaşayan 18 yaş üstü hastalarda HPV sıklığını ve HPV16, HPV18 ve 12 HR-HPV genotip dağılımını retrospektif olarak araştırmayı ve böylelikle

bölgemize ait moleküler epidemiyolojik veri sunmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Harran Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (06.09.2021 tarih ve HRU/21.15.30 sayı) onaylanmıştır.

Çalışmamıza Eylül 2017 – Nisan 2021 tarihleri arasında kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine başvuran 18 yaş üstü 685 hastadan alınan PreservCyt® solüsyonu içerisindeki servikal fırça numunesi dahil edildi. Tüm numuneler klinikten hızlıca laboratuvarımıza ulaştırılarak, çalışmalar yapılana kadar 2-8°C'da bekletildi. HPV genotiplendirmesi cobas 4800 tam otomatik (cobas® x480) ve real-time PCR (cobas® z 480) sistemi kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda çalışıldı. cobas® 4800 sistemi ile geçerli çalışmalar sonrası 14 farklı yüksek risk içeren HPV genotipine karşı üç farklı sonuç elde edildi. Bunlar: tek başına HPV16, tek başına HPV18 ve diğer 12 HR-HPV havuzu genotipi (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) pozitifliği idi. Tam otomatize sistem tarafından her bir çalışmada pozitif ve negatif kontrol sonuçları yanında, internal kontrol olarak numunedeki hücresel durum beta globin varlığı tespit edilerek kontrol edildi ve tüm bu verilerin otomatik analizi ile geçerliliği kontrol edildi.

BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 685 kadın hastanın 126'sında (%18.4) HR-HPV pozitifliği saptandı. Pozitif saptanan hastalarda HPV16, HPV18 veya diğer 12 HR-HPV pozitifliği sonuçlarından birisi saptandı. Çalışmamızda incelenen tüm numunelerde sadece tek HR-HPV pozitifliği saptanırken, birden fazla HPV genotipi ile pozitiflik gözlenmedi. Hastaların yaş ortalaması 39 (18-74) olarak saptanırken, farklı

Tablo 1. HPV tespiti için başvuran hastaların yaş gruplarının dağılımı

Yaş aralığı	Yaş Ortalaması	Toplam Sayı n (%)	HPV16 (+) n (%)	HPV18 (+) n (%)	Diğer 12 HR-HPV (+) n (%)	Saptanmadı n (%)
18-19	18	4 (0.6)	0 (0)	0 (0.0)	1 (0.1)	3 (0.4)
20-29	26	95 (13.9)	3 (0.4)	2 (0.3)	8 (1.8)	82 (12)
30-39	35	292 (42.6)	15 (2.2)	5 (0.7)	37 (5.4)	235 (34.3)
40-49	44	199 (29.1)	9 (1.3)	3 (0.4)	25 (3.6)	162 (23.6)
50-59	54	75 (10.9)	3 (0.4)	2 (0.3)	10 (1.5)	60 (8.8)
60-69	63	17 (2.5)	1 (0.1)	0 (0)	2 (0.3)	14 (2)
70-77	74	3 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.4)
Toplam	39	685 (100)	31 (4.5)	12 (1.8)	83 (12.1)	559 (81.6)

HR=Yüksek risk

Tablo 2. Yıllara göre HPV kontrolü için başvuran hastaların yaş ortalamalarının dağılımı

Yıllar	Yaş Ortalaması	Toplam Sayı n (%)	HPV16 (+) n (%)	HPV18 (+) n (%)	12 HR-HPV (+) n (%)	Saptanmadı n (%)
2017	39	103 (15)	2 (0.3)	2 (0.3)	13 (1.9)	86 (12.6)
2018	39	375 (54.7)	20 (2.9)	6 (0.9)	49 (7.2)	300 (43.8)
2019	39	170 (24.8)	9 (1.3)	4 (0.6)	19 (2.8)	138 (20.1)
2020	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2021	34	37 (5.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.3)	35 (5.1)
Toplam	39	685 (100)	31 (4.5)	12 (1.8)	83 (12.1)	559 (81.6)

HR=Yüksek risk

yaş gruplarında hasta dağılımları incelendiğinde 30-39 yaş aralığı grubunun diğer yaş gruplarına göre daha fazla hastaneye başvurduğu anlaşıldı. HR-HPV pozitifliğinin dağılımı yaş gruplarına göre incelendiğinde en sık 30-39 yaş grubunda pozitiflik olduğu görüldü. Tüm hastalarda HPV16 pozitifliği hastaların %4.5'unda saptanırken, HPV18 %1.8 ve diğer 12 HR-HPV genotipi pozitifliği ise %12.1 oranında saptandı (Tablo 1).

Yıllara göre hastaneye başvuru ve HPV genotip pozitiflikleri incelendiğinde 2018 yılında en fazla başvuru ve pozitifliğin saptandığı görülürken, 2020 yılında pandemi nedeniyle polikliniklerin kapalı olması ve uzun süren kapanmalar nedeniyle hiç hasta başvurusunun olmadığı takip eden yılda da pandeminin etkisinin devam ettiği görüldü. Tüm yıllarda diğer 12 HR-HPV pozitifliği hastalarda en fazla saptanan genotip olduğu görüldü (Tablo 2).

HPV16 pozitif 31 hastanın üçünde “Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon” (LSIL), ikisinde “Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon” (HSIL) ve birinde “Önemi belirsiz atipik skuamöz hücreler” (ASC-US) tipi saptandı. HPV18 pozitif 12 hastanın ise sadece birinde ASC-US saptandı. 12 yüksek risk HPV genotipini taşıyan 83 hastada ise bir LSIL, bir HSIL ve dört ASC-US belirlendi (Tablo 3).

TARTIŞMA

HPV enfeksiyonları ve özellikle HR-HPV enfeksiyonları servikal kanserlerin ana nedenidir ve çeşitli HPV genotipleri ile ilişkili olabilmektedir⁽⁹⁾. Ayrıca yaş, hormonal kontraseptif kullanımı, sigara, alkol tüketimi HPV enfeksiyonlarını etkileyerek servikal kanser gelişimine etki edebilmektedir⁽¹⁰⁾.

Tablo 3. Yüksek risk HPV pozitifliği saptanan hastalarda “smear”de saptanan patolojik değişimlerin dağılımları

	LSIL	HSIL	ASC-US	İnflamasyon	Bakteriyel Vajinoz benzeri vajinal flora
HPV16 (n=31)	3 (0.4)	2 (0.3)	1 (0.1)	19 (2.8)	6 (0.9)
HPV18 (n=12)	1 (0.1)	-	-	9 (1.3)	2 (0.3)
Diğer 12 HR-HPV (n=83)	1 (0.1)	1 (0.1)	4 (0.6)	62 (9.1)	15 (2.2)

HR=Yüksek risk; LSIL=Düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon; HSIL=Yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon; ASC-US=Önemi belirsiz atipik skuamöz hücreler

Mosmann ve ark.⁽¹⁰⁾ 2021 yılında yaptıkları çalışma incelendiğinde, genital numunelerdeki HPV pozitiflik oranının %18 olduğu görülmektedir. Jaworek ve ark.⁽¹¹⁾ 1198 servikal sürüntü numunesinde cobas 4800 ile yaptıkları karşılaştırma çalışmasında, numunelerin %21’inde HPV DNA tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Biz de benzer şekilde çalışmamızda hastalarımızın 126’sında (%18.4) en az bir HR-HPV genotipi saptandığını gördük. Smolarz ve ark.⁽¹²⁾ Polonya’da cobas 4800 sistemi ile 280 servikal hasta numunesi üstüne yaptıkları çalışmalarında, %20’sinde HPV16, %14’ünde HPV18 ve %33’ünde de diğer 12 HR-HPV saptadıklarını bildirmişlerdir. Wang ve ark.⁽¹³⁾ ise yine cobas® 4800 sistemi ile Çin’de 5650 asemptomatik kadın hastada yaptıkları çalışmada, HPV16’yı %2.25, HPV18’in %0.5, diğer 12 HR-HPV’nin ise %9.15 oranında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Cai ve ark.⁽¹⁴⁾ 2019 yılında Çin’de yaptıkları çalışmalarında hastalarının yaş ortalamasının 39.8 olduğunu ve çalışmaya dahil ettikleri 356 numunenin 65’inde HPV16, 5’inde HPV18 ve 57’sinde diğer 12 HR-HPV saptadıklarını bildirmişlerdir. Yurtdışında yapılan bu sonuçlar incelendiğinde yaş ortalamalarının bizim çalışmamızla benzer olduğu, pozitiflik oranlarında değişiklikler görülebilse de genel hatları ile diğer 12 HR-HPV’nin daha yüksek oranda, sonrasında HPV16 ve HPV18’in saptandığı görülmektedir. Bu da bizim sonuçlarımızla uyumlu görülmektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Gültekin ve ark.⁽⁸⁾ 2018 yılında bildirdikleri tarama çalışmasında özellikle 30-44 yaş aralığında daha sık HPV saptandığı, diğer HR-HPV’lerin HPV-16 ve HPV18’den daha yüksek görüldüğü bildirilmiştir. Tarama sonuçlarına göre numunelerin sadece %3.5’inde HPV pozitifliği saptandığı görülmektedir⁽⁸⁾. Demirci ve ark.⁽⁹⁾ yaptıkları çalışmalarında ise hastaların %26.3’ünde HPV pozitifliği saptadıkları

fakat bu çalışmada hem HR-HPV hem de LR-HPV tiplerinin incelendiği görülmektedir. Beyazit ve ark.⁽¹⁵⁾ 201 hastada yaptıkları çalışmalarında HPV DNA’nın %45.2 oranında saptandığını bildirmişlerdir. Fındık ve ark.⁽¹⁶⁾ 2019 yılında yaptıkları çalışmada kadınların %3.1’inde HPV tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmaya dahil olan hastaların yaş ortalamasının 42 olduğu görülmektedir. Muderris ve ark.⁽¹⁷⁾ da 495 kadının dahil olduğu çalışmada yaş ortalamasının 37 olduğunu, en yüksek 30-39 yaş grubunda hastanın çalışmaya dahil olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmaya dahil olan tüm kadınların HPV ile enfekte olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca HPV16’nın %36.9, HPV18’in ise %13.9 oranında olduğu bildirilmiştir⁽¹⁷⁾. Biz de çalışmamızda HPV16 pozitifliğini hastaların %4.5’ünde, HPV18 pozitifliğinin %1.8 ve diğer 12 HR-HPV genotipi pozitifliğinin ise %12.1 oranında olduğunu saptadık. Ülkemizdeki çalışmalar incelendiğinde, çalışılan yöntem, bölgeye, hasta sayılarına göre HPV DNA sonuçlarında ciddi farklılıklar olabildiği görülmektedir. Bunun nedeninin bize sosyoekonomik seviye ve yaşam tarzları olabileceğini düşündürmüştür. Başvuran hastaların yaş ortalamalarının benzerlik gösterdiği, özellikle 30-39 yaş aralığında bizim çalışmamıza benzer şekilde yükseklik saptandığı görülmektedir. LR-HPV genotiplerinin varlığını saptayan çalışmaların özellikle bu oranların yüksekliğine katkı sağladığı görülmektedir.

Demirci ve ark.⁽⁹⁾, HPV16’nın ASC-US ve LSIL patolojili hastalarda, HPV18’in ise HSIL hastalarda sık saptandığını bildirmişlerdir. Karimi-Zarchi ve ark.⁽¹⁸⁾ benzer şekilde HPV16’nın ASC-US patolojili hastalarda sık olduğunu tespit etmişlerdir. Wang ve ark.⁽¹⁹⁾ HSIL patolojili hastalarda HPV16’nın %34, HPV18’in %16 oranında pozitif saptandığını bildirmişlerdir. Xue ve ark.⁽²⁰⁾ LSIL hastalarda, HPV16’nın %5.4,

HPV18'in %2.98 saptandığını tespit etmişlerdir. Bu veriler patolojilere göre genotip dağılımlarının hasta sayısına, coğrafik konuma, yaş gruplarına göre farklılıklar gösterdiğini bize düşündürmüştür.

Sonuç olarak çalışmamız verileri bölgemizde hastanemize başvuran kadınlarda HPV16 ve HPV18 pozitifliği yanında diğer HR-HPV genotiplerinin de olduğunu, HPV16 ve HPV18'e karşı aşı ile korunma sağlanabilecek olmasına karşın bazı HR-HPV genotiplerinin ilerleyen süreçte sorun olabileceğini bize düşündürmüştür. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP)'nin 2019 önerilerine göre diğer 12 HR-HPV için yıllık HPV testiyle birlikte altı aylık aralarla sitoloji takibi veya üç yıllık HPV testiyle birlikte yılda bir sitoloji takibi önerilir⁽²¹⁾. Yine bu hastalara servikal intraepitelyal neoplazi ve servikal kanserin önlenmesi için dokuzlu HPV aşısı önerilebilir. Verilerimiz bölgemizdeki durum hakkında moleküler epidemiyolojik bir veri sunmaktadır.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Harran Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (06.09.2021 tarih ve HRU/21.15.30 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Harran University, Clinical Research Ethics Committee (09.06.2021; HRU/21.15.39).

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. International Human Papillomavirus Reference Center (IHRC). [https://www.hpvcenter.se/] (Erişim tarihi: 08.Eylül.2023).
2. Ozaydin-Yavuz G, Bilgili SG, Guducuoglu H, Yavuz IH, Elibuyuk-Aksac S, Karadag AS. Determinants of high-risk human papillomavirus infection in anogenital warts. *Postepy Dermatol Alergol*. 2019;36(1):76-81. https://doi.org/10.5114/ada.2019.82915
3. Del Valle-Mendoza J, Becerra-Goicochea L, Aguilar-

Luis MA, et al. Genotype-specific prevalence of human papillomavirus infection in asymptomatic Peruvian women: a community-based study. *BMC Res Notes*. 2021;14(1):172.

https://doi.org/10.1186/s13104-021-05588-7

4. 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
5. Tanton C, Soldan K, Beddows S, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) infection and cervical cancer prevention in Britain: Evidence of differential uptake of interventions from a probability survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(5):842-53. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-1333
6. Lee CY, Tseng CJ, Chang CC, Lee MC, Yang SF. Postpartum HPV vaccination rate and differences in background characteristics between HPV vaccinated and unvaccinated postpartum women: Strict monitoring and follow-up of postpartum HPV vaccination program. *Front Immunol*. 2021;12:626582. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626582
7. Aftab M, Poojary SS, Seshan V, et al. Urine miRNA signature as a potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarker in cervical cancer. *Sci Rep*. 2021;11(1):10323. https://doi.org/10.1038/s41598-021-89388-w
8. Gultekin M, Zayifoglu Karaca M, Kucukyildiz I, et al. Initial results of population based cervical cancer screening program using HPV testing in one million Turkish women. *Int J Cancer*. 2018;142(9):1952-8. https://doi.org/10.1002/ijc.31212
9. Demirci M, Guzel AD, Ersahin AA, Yorulmaz E, Ersahin SS, Borsa BA. Human papillomavirus prevalence and genotype distribution among Turkish women with or without cervical lesion. *Indian J Med Microbiol*. 2018;36(4):517-21. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_232
10. Mosmann JP, Zayas S, Kiguen AX, Venezuela RF, Rosato O, Cuffini CG. Human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in oral and genital mucosa of women with normal and abnormal cervical cytology. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):422. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06118-3
11. Jaworek H, Koudelakova V, Drabek J, et al. A head-to-head analytical comparison of Cobas 4800 HPV, PapilloCheck HPV screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP for detection of human papillomavirus DNA in cervical and cervicovaginal swabs. *J Mol Diagn*. 2018;20(6):49-58. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.07.004
12. Smolarz B, Samulak D, Szyłto K, et al. Cobas 4800 HPV detection in cervical samples of Polish women. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2019;23(2):92-5. https://doi.org/10.5114/wo.2019.85880
13. Wang S, He X, Meng F, Pan Q, Zhang L, Zeng J. Application

- of the Cobas 4800 system for the detection of high-risk human papillomavirus in 5650 asymptomatic women. *Biomed Res Int.* 2020;2020:1635324. <https://doi.org/10.1155/2020/1635324>
14. Cai X, Guan Q, Huan Y, Liu Z, Qi J, Ge S. Development of high-throughput genotyping method of all 18 HR HPV based on the MALDI-TOF MS platform and compared with the Roche Cobas 4800 HPV assay using clinical specimens. *BMC Cancer.* 2019;19(1):825. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6036-z>
 15. Beyazit F, Silan F, Gencer M, et al. The prevalence of human papillomavirus (HPV) genotypes detected by PCR in women with normal and abnormal cervico-vaginal cytology. *Ginekol Pol.* 2018;89(2):62-7. <https://doi.org/10.5603/GP.a2018.0011>
 16. Findik S, Findik S, Abuoğlu S, Cihan FG, İlter H, İyisoy MS. Human papillomavirus (HPV) subtypes and their relationships with cervical smear results in cervical cancer screening: a community-based study from the central Anatolia region of Turkey. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(4):1391-8.
 17. Muderris T, Afsar I, Yıldız A, Akpınar Varer C. HPV genotype distribution among women with normal and abnormal cervical cytology in Turkey. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32(6):516-24.
 18. Karimi-Zarchi M, Tabatabaie A, Dehghani-Firoozabadi A, et al. The most common type of HPV in women with atypical squamous cell of undetermined significance (ASCUS) in pap smear in Iran-Yazd. *Int J Biomed Sci.* 2015;11(4):173-5.
 19. Wang Z, Liu T, Wang Y, et al. Risk of cervical lesions in high-risk HPV positive women with normal cytology: a retrospective single-center study in China. *Infect Agent Cancer.* 2020;15:34. <https://doi.org/10.1186/s13027-020-00291-x>
 20. Xue H, Gao H, Zheng J, et al. Use of extended HR-HPV Genotyping in improving the Triage Strategy of 2019 ASCCP recommendations in Women with positive HR-HPV diagnosis and simultaneous LSIL cytology results. *J Cancer.* 2021;12(14):4332-40. <https://doi.org/10.7150/jca.55826>
 21. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, et al. 2019 ASCCP risk-based management consensus guidelines for abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2020;24(2):102-31. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000525>

Ticari Dizel Yağının Çevresel Mikroorganizmalar ile Bozunması Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi

Determination of the Efficacy of Commercial Diesel Oil on Degradation by Environmental Microorganisms

Cansu Vural[✉]

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye

Atıf/Cite as: Vural C. Ticari dizel yağının çevresel mikroorganizmalar ile bozunması üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):278-286.

Öz

Amaç: Dizel yağı; motorlu araçlarda kullanılan, birçok çevre sorununu oluşturan çevre kirleticileri olarak kabul edilebilir. Mikrobiyal konsorsiyum, petrol hidrokarbonlarının bozunmasında önemli bir rol oynayabilir. Spesifik hidrokarbonlar üzerindeki yeni mikrobiyal ayrıştırıcıların taranması, çevre için çeşitli tehlikeleri olan hidrokarbonların uzaklaştırılması için yeni bakış açıları sağlar. Bu çalışmada, mikrobiyal konsorsiyumun dizel yağının bozunması üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlandı.

Yöntem: Aktif mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulması için petrokimya endüstrisinden ham petrol örnekleri toplandı. Geniş tarama yapabilmek için kültür ortamlarında n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı kullanıldı. Daha sonra, bozunma deneyi %0,5 ve %0,25 dizel yağı eklendi ve çeşitli karbon kaynaklarıyla zenginleştirilen ortamlardan 50 ml ilave edilerek gerçekleştirildi. Erlenler, 21 gün boyunca 200 rpm'de döner çalkalayıcıda 30°C'de inkübe edildi. Analitik analizler; Gaz Kromatografisi ve gravimetrik analiz ile yapıldı. Seçilen izolatların gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz ve KOH testleri, lipaz ve proteaz aktiviteleri tarandı. Başarılı izolatları belirlemek için genomik DNA izolasyonları ve moleküler analizler yapıldı.

Bulgular: CT1 konsorsiyumu başarılı parçalayıcı aktivite göstermiştir. GC ve gravimetrik analizleri sonucunda CT1 konsorsiyumu dizel yağının 21 günde %93 oranında bozundurmıştır. Bu konsorsiyumun üyeleri *Citrobacter* sp., *Pseudomonas japonica* ve *Bacillus* sp. olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile CT1 konsorsiyumundaki bakteriler ile dizel yağının neredeyse tamamını bozundurmıştır. Bu şekilde izole edilen bakteriler; kirlenmiş toprakların çevre dostu bir şekilde iyileştirilmesi için umut verici bir çözüm olarak hizmet edebilirler. Dizel yağı biyoparçalanması, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak ve çevresel etkileri azaltmak için önemli bir adım olabilir. Bu nedenle, bu alanda yapılan ilerici çalışmalar, sürdürülebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Biyoteknolojik yöntemler kullanarak mikroorganizmaların dizel yağı parçalama yeteneklerini artırılabilir.

Anahtar kelimeler: Biyobozunma, Dizel yağı, Mikrobiyal Konsorsiyum

ABSTRACT

Objective: Diesel oil can be considered as an environmental pollutant used in motor vehicles, causing environmental problems. The microbial consortium can play an important role in the degradation of petroleum hydrocarbons. The screening of new microbial decomposers on specific hydrocarbons provides new perspectives for the removal of hydrocarbons with various hazards to the environment. This study aimed to determine the effects of microbial consortium on the degradation of diesel oil.

Methods: Crude oil samples were collected from the petrochemical industry to establish the active microbial consortium. In order to perform wide screening, n-tridecane, n-tetradecane, n-hexadecane, sunflower oil, and olive oil were used in the culture media. Then, the degradation test was carried out by adding 0.5% and 0.25% of diesel oil and adding 50 ml of media enriched with various carbon sources. The bottles were incubated at 30°C on a rotary shaker at 200 rpm for 21 days. Gas Chromatography and gravimetric analysis did analytical analyzes. Gram reactions of selected isolates were screened in catalase, oxidase, KOH tests, lipase and protease activities. Genomic DNA isolations and molecular biological analyzes were performed to identify successful isolates.

Results: The CT1 consortium showed successful disintegrating activity. As a result of GC and gravimetric analysis, the CT1 consortium degraded 93% of diesel oil in 21 days. Members of this consortium are *Citrobacter* sp., *Pseudomonas japonica*, and *Bacillus* sp. have been determined.

Conclusion: CT1 consortium degraded 93% of the diesel oil. Diesel oil biodegradation could be an important step towards reducing dependence on fossil fuels and reducing environmental impacts.

Keywords: Biodegradation, Diesel oil, Microbial Consortium

Alındığı tarih / Received:

14.06.2023 / 14.June.2023

Kabul tarihi / Accepted:

11.11.2023 / 11.November.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

C. Vural 0000-0001-7500-6691

✉ caansudogan@gmail.com

GİRİŞ

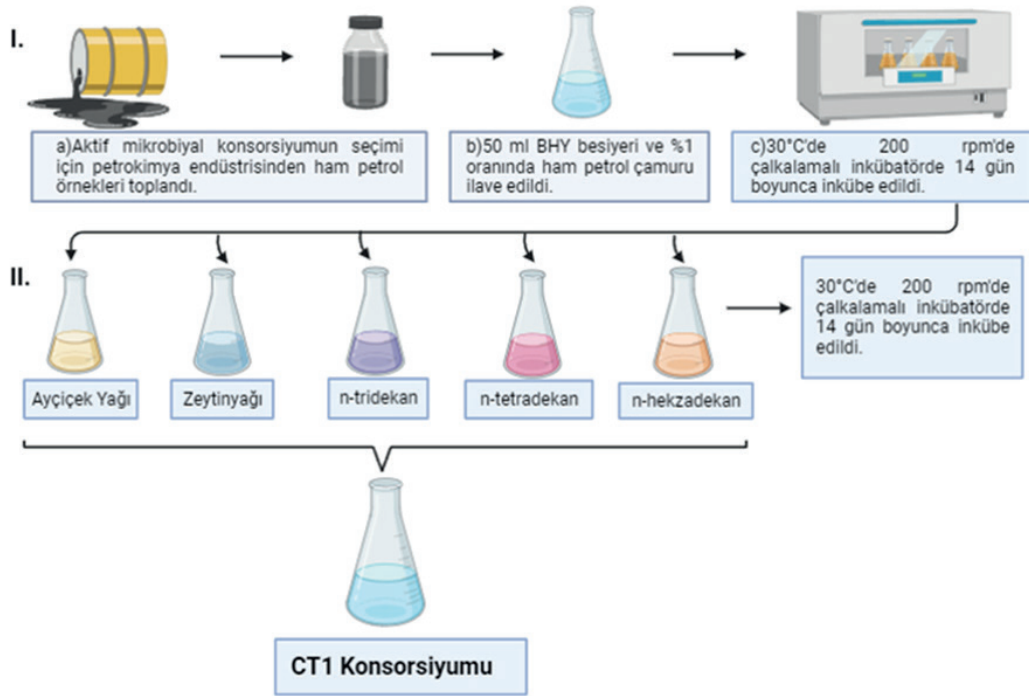
Son yıllarda petrol kaynaklarının sık kullanılmasıyla birlikte birçok çevre sorunu yaşanmaktadır. Dizel yağları veya madeni yağlar, otomobillerde ve hafif ticari araç motorlarında günlük olarak kullanılan ham petrolden elde edilir ve motorları korozyona bağlı problemlere karşı korurlar. Ancak; petrol kaynaklarının sıklıkla kullanımıyla birçok çevresel problem yaşanmaktadır. Özellikle petrol taşımacılığıyla meydana gelen petrol sızıntısı kazaları ve iyi arıtılmamış yağlı atık suların deşarjı gibi çevresel problemler meydana gelmektedir. Bu çevre sorunlarını ortadan kaldırmak için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler uygulanabilmektedir. Bu yöntemlerden biyolojik yöntemler, fiziksel ve kimyasal yöntemlerden farklı olarak ekolojik dengeyi bozmadan uygulanabilen, çevre dostu ve düşük maliyetli bir uzaklaştırma işlemidir⁽¹⁻³⁾. Bu nedenle, mikrobiyal konsorsiyum petrol hidrokarbonlarının parçalanmasında önemli bir rol oynayabilir. Petrol hidrokarbonları bakteriler, mantarlar, mayalar ve mikroalgler tarafından parçalanabilir. Bununla birlikte, biyolojik bozunmada bakterilerin önemli bir üstünlüğü vardır. Bakteriler, çok düşük moleküler ağırlıklı alkanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), C9 ila C23 arasında değişen alifatik hidrokarbonlar ve çeşitli aromatik bileşiklerden oluşan dizel yağını bozabilir^(4,5). Örneğin, *Acinetobacter* sp. tek karbon kaynağı olarak n-alkanları (C10 - C40) kullanır⁽³⁾. Benzer şekilde, *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* ve *Oleispira* gibi zorunlu hidrokarbonoklastik bakteriler olarak adlandırılan bazı mikrobiyal cinsler, çeşitli alkan parçalanma süreçlerinde önemli bir rol oynar. Bu mikroorganizmalar tipik olarak petrol ile kirlenmeden önce tespit edilemeyen seviyelerde bulunurlarken, petrol kirliliğinden sonra bölgede baskın hale geçmektedirler^(1,6-8). Bu nedenle, bu mikroorganizmalar çevredeki petrol hidrokarbonlarının bozulması, dönüşümü ve kaderi için gereklidir.

Biyolojik bozunma önceliği genellikle n-alkanlardan dallı alkanlara, düşük moleküler ağırlıklı n-alkil aromatlara, monoaromatlara, siklik alkanlara ve polinükleer aromatlara doğrudur⁽⁴⁾. Petrolün

tüm bu bileşenlerini tek bir mikrobiyal türle parçalamak zor olduğundan, mikrobiyal konsorsiyum uygulamalarının gerekliliği iyi bilinmektedir. Mikrobiyal bir konsorsiyum, birçok farklı bakteri grubunun metabolik işlevi de dahil olmak üzere, biyobozunma daha geniş bir enzim aktivitesi aralığına sahiptir⁽⁹⁾. Spesifik hidrokarbonlar üzerinde yeni mikrobiyal ayrıştırıcıların taranması, çevre için çeşitli tehlikeleri olan hidrokarbonların uzaklaştırılması için yeni bakış açıları sağlar. Bu amaçla çalışmada, çevresel mikroorganizmaların ticari dizel yağını (15W40) bozundurma üzerindeki etkileri araştırıldı. Aktif mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulması için petrokimya endüstrisinden ham petrol örnekleri toplandı. Geniş tarama yapabilmek için farklı karbon kaynakları (n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı) enerji kaynağı olarak kullanılarak kültür ortamlarında inkübe edildi. Analitik analizler için; gravimetrik analizi ve gaz kromatografisi yapıldı. Toplam miktardan kalan dizel yağını belirlemek için dizel yağı bileşimi analizleri yapıldı. Seçilen konsorsiyumdan üç farklı mikrobiyal izolat konsorsiyum üyesi olarak üretildi. Bu izolatlar çeşitli mikrobiyolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak bu üyelerin saflıkları ve farklılıkları tespit edildi. Ayrıca moleküler biyolojik analizler ile bu izolatların hangi türler ile yakın benzerlik gösterdiği belirlendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mikrobiyal Konsorsiyumun Oluşturulması: Tüm degradasyon çalışmaları, bazal ortam olarak Bushnel Haas (BHY; Sigma Aldrich) ortamı (%0.025 maya özütü eklenmiş) ile gerçekleştirildi. Aktif mikrobiyal kültürler elde etmek için iki adım izlendi. İlk adım olarak, petrokimya endüstrisinin ham petrol çamuru, toplam petrol hidrokarbonlarını kullanabilen mikroorganizmaların seçimi için bir rezervuar olarak kullanıldı. Bu amaçla; %1 oranında ham petrol çamuru ilave edilerek 30°C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde 14 gün boyunca inkübe edildi (Şekil 1). İnkübasyon süresi boyunca 48 saatte bir erlenlerdeki bulanıklık ve cam iç yüzeyinde oluşan biyofilm yapıları takip edilerek mikrobiyal üreme durumları gözlemlendi. İnkübasyon sonunda ikinci adım olarak; dizel yağı içeriğinde bulunan orta



Şekil 1. Mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulma şeması

zincirli alifatik hidrokarbonlardan olan n-tridekan (C13), n-tetradekan (C14), n-hekzadekan (C16) ile, yine benzer molekül yapılarına sahip evsel kullanım yağlarından ticari ayçiçek yağı ve zeytinyağı spesifik hidrokarbon kaynakları olarak kullanıldı. Bahsedilen her bir hidrokarbon kaynağından %1 oranında olacak şekilde 50 ml BHY ortamı içeren erlenlere eklendi. Daha sonra, birinci basamakta oluşan mikrobiyal üremelerin gözlendiği erlenlerden %5 olacak şekilde alınarak içerisinde spesifik hidrokarbon bulunan her bir erlen üzerine ilave edilerek 30°C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde 14 gün boyunca inkübe edildi. Mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulması için, 14 günlük inkübasyon sonunda her bir erlen iyice çalkalanarak içerisinde üreyen mikroorganizmalar homojen hale getirildikten sonra, mikrobiyal karışım içeren bu erlen dizel yağının bozunması çalışmasında kullanıldı.

Dizel Yağının Biyolojik Bozunma Testi: Dizel yağının biyolojik bozunması amacıyla, ticari olarak madeni yağ olarak nitelendirilen 15W40 motorin yağı kullanıldı. Bir önceki aşamadan elde edilen homojen haldeki mikrobiyal karışımdan %5 olacak şekilde alınarak 5ml steril nutrient broth (NB) içeren

tüpe aktararak 30°C'de 24–48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üreme olan tüpten bir ml alınarak 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 6000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücrelerin yıkanması için, süpernatant atılarak elde edilen hücre pelleti üzerine bir ml steril %0.89 NaCl ilaveli fosfat tamponlu tuz (PBS) eklenerek kısa bir vorteks ile homojen hale getirildikten sonra aynı şekilde santrifüjlendi. Daha sonra hücre yoğunluğu densitometre cihazı (Den-1B; Grant Instruments) ile 545 ± 15 nm dalga boyunda 0.5 McFarland (MF)-Birim'e ($\sim 1.5 \times 10^8$ hücre/ml) ayarlandı⁽¹⁰⁾. MF'ye göre ayarlanmış hücrelerin %5'i, dizel yağının (15W40) %0.5'i ve %0.25'i ve 50 ml BH sıvı ortamı (%0.05 maya ekstraktı ile takviye edilmiş) içeren sterilize edilmiş şişeye ayrı ayrı aktarıldı. Daha sonra, 30°C'de 200 rpm'de döner bir çalkalayıcıda 21 gün boyunca bozunma için inkübasyonuna izin verildi. Emülsifikasyon ve bulanıklık olarak bozunma gözlemi inkübasyon sırasında günlük olarak yapıldı.

Bozunma oranını belirlemek için gravimetrik analiz yöntemi kullanıldı. Bu amaçla; kalan yağlar diklorometan ile 1:1 oranında çözündürüldü. Karışım beş dakika vortekslelendikten sonra organik faz toplandı.

Sulu faz iki kez çözündürüldü. Çözücü, evaporatör kullanılarak uçuruldu. Bozunmuş hidrokarbon yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı⁽¹¹⁾:

$$YBO (\%) = \frac{(\text{Kontrol kültüründe KYA} - \text{Numunede KYA}) \times 100}{\text{Kontrol kültüründe KYA}}$$

Bu formülde, YBO = Yağ Bozunma Oranı ve KYA = Kalan Yağın Ağırlığı temsil etmektedir.

Gaz Kromatografisi ile Dizel Yağ Diyagramının Standart Eğrisinin Oluşturulması: Standart eğri oluşturmak için Gaz Kromatografisi (GC) kullanıldı. Dizel yağı çözeltilerinin diklorometan (DCM) içinde seri dilüsyonları (0.1 µg/ml'den 0.01 µg/ml'ye) hazırlandı ve GC'de analiz edildi. GC cihazı (Agilent 7820A, Santa Clara, CA, ABD), alev iyonlaşma detektörü HP-5 kapiler kolonu (30 m x 0,320 mm; film kalınlığı 0,25 mm; Agilent, ABD) ile donatıldı. Enjektör ve detektör sıcaklığı sırasıyla 230°C ve 300°C idi. Taşıyıcı gaz, helyum (1 mL/dak); hava akışı, 300 mL/dak; hidrojen akışı ise; 30 mL/dak idi. Analiz yöntemi şu şekilde yapılandırıldı; başlangıç sıcaklığı bir dakika süreyle 70°C idi, sıcaklık kademeli olarak 10°C/dk artırıldı. 300°C'ye kadar ve tutma süresi 35 dakikaydı⁽¹¹⁾. GC'de dikkate alınan toplam alan sonuçları standart eğri diyagramı olarak değerlendirildi ($r^2=0,9955$). Bir µl numune hacmi HP-5 kolonuna enjekte edildi ve yukarıda bahsedilen GC yöntemi ile analiz edildi.

Dizel Yağının Bozunmasının Tayini: Dizel yağı, sıvı-sıvı (1:1 v/v) DCM'de özümlendi. 21 gün sonra eşit hacimde DCM, mikrobiyal popülasyon ve mazot içeren BHY ortamına eklendi. DCM-BHY, beş dakika boyunca maksimum hızda vorteks yoluyla hemen karıştırıldı. Bu prosedür BHY ortamı için iki kez tekrarlandı⁽¹²⁾. Daha sonra, bozunmuş kalan dizel yağının belirlenmesi için dizel yağı bileşiminin GC analizi yapıldı.

Mikrobiyal Kültürlerin İzolasyonu: İnkübasyon süresinden sonra, CT1 konsorsiyumunu içeren mikroorganizmalar saflaştırıldı. Bu amaçla; Nurient Agar (NA) petriplerde çizgi ekim yöntemi kullanılarak izole edildi⁽¹²⁾.

Tablo 1. Mikrobiyal yapı belirlemede kullanılan primer setleri

Primer	Nükleotid Dizisi
11F	5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3'

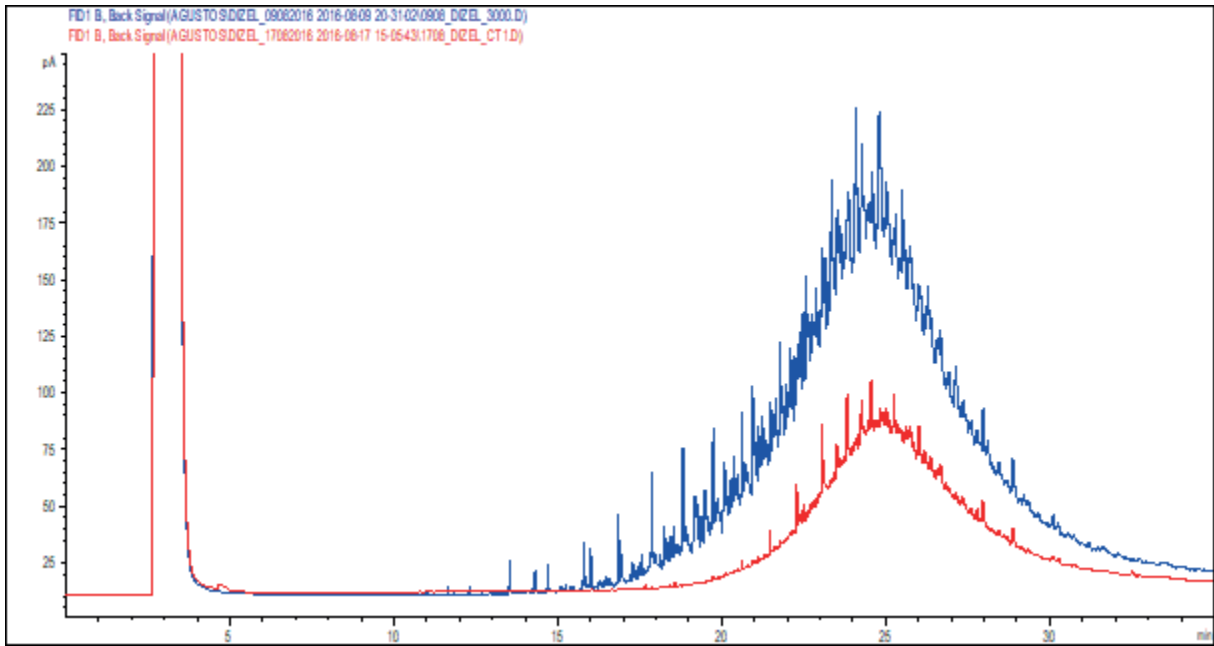
Biyokimyasal ve Enzimatik Tayin: Saflaştırılan izolatlar, biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonlar açısından ayrıntılı olarak analiz edildi. Bunun için mikrobiyal hücreler gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz ve KOH tahlillerinde değerlendirildi⁽¹³⁾. Lipaz ve proteaz aktiviteleri tarandı⁽¹⁴⁾.

Konsorsiyum Üyelerinin Belirlenmesi İçin Moleküler Analizler: Tüm mikrobiyal izolatlar için ZR Fungal/Bakteri DNA MiniPrep™ (Zymo Research, ABD) ile DNA izolasyonları yapıldı. DNA konsantrasyonları ve saflıkları UV-Vis spektrofotometre (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, ABD) ile analiz edildi. 16S rRNA kodlayan gen bölgesi, 11F-1492R primer setleri kullanılarak amplifiye edildi (Tablo 1). Bu işlem için gerçekleştirilen PCR protokolü, başlangıç denatürasyon için 95°C 'de beş dk. bir döngü; amplifikasyon için 40 döngü boyunca denatürasyon 95°C'de 20 sn., 50°C'de 40 sn. ve 72°C'de 80 sn. olarak belirlendi⁽¹²⁾. Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel (%2 w/v) elektroforezinde çalıştırıldı ve biyogörüntüleme sistemi (Biospectrum UVP, Birleşik Krallık) altında görüntülendi. Daha sonra PCR ürünleri sekanslandı.

BULGULAR

CT1 konsorsiyumunda gözlenen erlenler arasında en iyi parçalanmanın %0,5 oranında dizel yağı içeren olduğu tespit edildi. Bu örnekte biyolojik bozunma oranının belirlenmesi amacıyla yapılan gravimetrik analize göre evaporatör sonrasında kalan yağın ağırlığı 0,1027 gr ve kontrolde ise; 0,1861 gr olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre hidrokarbonun biyolojik bozunma yüzde hesaplama formülüne %93 olarak elde edildi.

Şekil 2'de de GC analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar verilmektedir. Mavi renkte gösterilen kromatogram yalnızca %0,5 oranında



Şekil 2. Dizel yağının CT1 konsorsiyumunda bozunmasının GC analizi ile tayini

15W40 dizel yağını içeren kontrol örneğine aittir. Kırmızı kromotogram ise; CT1 konsorsiyumunun bulunduğu erlende kalan dizel yağı miktarını temsil etmektedir. GC sonuçları, dizel yağının ana bileşenleri olan çok çeşitli alkanları parçalayabildiğini de gösterdi.

CT1 konsorsiyumunda bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla saflaştırılarak CT1-1, CT1-2 ve CT1-3 izolatları elde edildi. Saflaştırılan izolatlar, biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonlarının belirlenmesi açısından ayrıntılı olarak analiz edildi. Bu amaçla; mikrobiyal hücreler gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz ve KOH tahlillerinde değerlendirildi. Lipaz ve proteaz aktiviteleri tarandı (Tablo 2).

Tablo 2’de CT1 izolatlarına ait biyokimyasal testlerin ve enzimatik reaksiyonların sonuçları verilmektedir. Bunun sonucunda; CT1-1 ve CT1-2 izolatlarının gram negatif, CT1-3 izolatının ise gram pozitif bakteri olduğu tespit edildi. KOH testi; CT1-1 ve CT1-2 izolatlarında pozitif, CT1-3 izolatında negatifti. Tüm izolatlarda katalaz aktivitesi tayin edilirken; oksidaz enziminin aktivitesi yalnızca CT1-2 izolatında belirlendi. Lipaz ve proteaz aktiviteleri sadece CT1-3 izolatında tespit edildi.

Tüm mikrobiyal izolatların tanılanması amacıyla yapılan moleküler analizler sonucunda dizel yağının bozunmasını gerçekleştiren mikrobiyal yapı belirlendi. Buna göre; CT1-1 izolatının %99 oranında

Tablo 2. Biyokimyasal testler ve enzimatik reaksiyonların sonuçları

İzolatlar	Gram reaksiyonları	KOH testi	Katalaz	Oksidaz	Lipaz aktivitesi	Proteaz aktivitesi
CT1-1	-	+	+	-	-	-
CT1-2	-	+	+	+	-	-
CT1-3	+	-	+	-	+	+

Tablo 3. NCBI veri tabanında BLAST edilen dizilerden dominant türler ve % benzerlikleri

İzolat Adı	Organizma Adı	Genbank % Benzerlik Oranı
CT1-1	<i>Citrobacter</i> sp.	%99
CT1-2	<i>Pseudomonas japonica</i>	%100
CT1-3	<i>Bacillus</i> sp.	%100

Citrobacter sp., CT1-2 izolatının %100 oranında *Pseudomonas japonica* ve CT1-3 izolatının %100 oranında *Bacillus* sp. olduğu bulundu (Tablo 3).

TARTIŞMA

Dizel yağı gibi petrol türevleriyle kirlenmiş olan ortamların biyolojik olarak giderilmesi çevre dostu ve uygun maliyetlidir. Bu çalışmada; ham petrol ile kirlenmiş topraklardan toplanan örnekler aktif biyobozunmayı gerçekleştirecek olan mikrobiyal konsorsiyumun seçimi için n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı kullanıldı. Bu zenginleştirme sonrasında oluşturulan konsorsiyumlardan CT1 bakteriyal konsorsiyumu ile 15W40 dizel yağını 21 günde %93 oranında bozundurmıştır. Nikhil et al.⁽¹⁵⁾ petrolle kirlenmiş topraktan izole edilen *Micrococcus* sp. ve *Pseudomonas* sp. tarafından dizel motor yağının biyolojik bozunma oranını incelemişlerdir. 25 günlük inkübasyon süresinden sonra *Pseudomonas* sp. dizel yağının %67.57'sini ve *Micrococcus* sp. ise %52.95 oranında gidermişlerdir. Ancak *Micrococcus* sp. ve *Pseudomonas* sp. karışımı birlikte denendiğinde 25 gün sonra dizel motor yağının %89.98'ini bozmak için büyük bir potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir⁽¹⁵⁾. Petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş topraklarda emülsifiye edici ve dizel bozundurucu bakteri popülasyonlarının değerlendirildiği başka bir çalışmada *Serratia marcescens* C11S1, *S. marcescens* C7S3A, *Citrobacter freundii* CCC4DS3, *Raoultella ornithinolytica* C5S3, *Stenotrophomonas maltophilia* CCC10S1 ve *Stenotrophomonas pavanii* C5S3FN suşlarını içeren bir konsorsiyum da %97 oranında dizel bozunması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir⁽¹⁶⁾. Demeter ve ark.⁽¹⁷⁾ birçok çalışmanın tek izolatlar yerine mikrobiyal konsorsiyumları tercih ettiğini,

çünkü mikrobiyal konsorsiyumların metabolik aktiviteyi uyarak saf kültürlerle göre daha yüksek bir bozunma oranına neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Ham petrolün bozunma verimliliği sadece mikrobiyal faktöre bağlı değildir. Aynı zamanda hem çevresel faktörlere hem de ham petrolün miktarına da bağlıdır⁽¹²⁾. Bu çalışmada dizel yağının gideriminde en verimli olan CT1(%0,5) konsorsiyumundan üç bakteri izolatının bozunmada etkili olduğu görülmüştür. Hidrokarbon konsantrasyonundaki azalma, CT1-1, CT1-2 ve CT1-3 izolatlarının ham petrolü etkili bir şekilde parçaladığını göstermektedir. Yüksek konsantrasyonda dizel yağının (%0,5) varlığında hidrokarbon parçalayıcı suşların etkinliği, ham petrolün toksik etkisine karşı yüksek tolerans gösterdiklerinin göstergesidir. Bu çalışmada da olduğu gibi; mikroorganizmaların daha yüksek konsantrasyonlarda dizel yağının parçalayabilmesi, çevresel açıdan önemlidir. Çünkü bu yetenek, petrol ürünlerinin sızıntıları veya kirlilik olayları sonucunda ortaya çıkan çevresel kirliliği azaltmada etkili bir yöntem sunabilir. Bu yetenek; çevresel kirliliği azaltma, ekonomik fayda ve biyoremediasyon gibi bazı nedenlerden dolayı oldukça önemlidir^(1,2). Özellikle bu çalışmada da işlev görecektir olan mikrobiyal konsorsiyumun seçimi için petrokimya endüstrisinden ham petrol örnekleri toplanmıştır. Geniş tarama yapabilmek için; kültür ortamlarında tek karbon ve enerji kaynağı olarak n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı kullanılmıştır. Bunun sonucunda da dizel yağının parçalanmasında kullanılan konsorsiyum hidrokarbon bozunmasında daha etkili ve dirençli olmuştur. Literatürde bazı çalışmalar, bakteri topluluğunun hidrokarbona önceden maruz kalmasının, daha sonra yağ eklenmesine hızla yanıt verebilecek popülasyonların seçilmesine yol açtığını bildirmiştir^(18,19).

CT1 konsorsiyumundaki dizel yağının bozunmasını gerçekleştiren izolatlar; *Citrobacter* sp., *P. japonica* ve *Bacillus* sp.'dir. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, vb. bakteriler, hidrokarbonla kirlenmiş toprakların biyolojik gideriminde oldukça etkili oldukları iyi bilinmektedir⁽²⁰⁾. Özellikle,

Bacillus sp. gibi gram pozitif bakteriler, çoğunlukla petrol ürünlerinden oluşan daha dirençli PAH'ların biyobozunması için de kullanılabilirler. Örneğin; Ekvador'da ham petrolle kirlenmiş bölgelerden izole edilen *Bacillus thuringiensis* B3 ve *Bacillus cereus* B6 suşları 30 günde sırasıyla %84 oranında dizeldeki PAH'ları gidermişlerdir ve ham petrol ile kirlenmiş topraklardan toplam petrol hidrokarbonlarını %94 oranında uzaklaştırmışlardır⁽²¹⁾. Kullanılmış motor yağı ile kirlenmiş topraktan izole edilen *Ochrobactrum anthropi* HM-1 ve *Citrobacter freundii* HM-2'nin gama radyasyonu ile ısıtılmış bakteriyel karışımın bozunma etkinliği %95 olurken; ısıtılmamışta ise %79 olduğu görülmüştür⁽²²⁾. Yine, literatürde bazı bakteri türlerinin 20'den fazla karbon atomuna sahip uzun zincirli alkan moleküllerini asimile edebildiği belirtilmiştir⁽²³⁻²⁵⁾. Alkanların biyolojik olarak ayrışmasına katkıda bulunan enzimler arasında Sitokrom P450 enzimleri, integral membran di-demir alkan hidroksilazlar (örneğin AlkB), çözünür di-demir metan monooksijenazlar ve membrana bağlı bakır içeren metan monooksijenazlar bulunmaktadır^(1,26). Alkan hidroksilaz (AH) enzimleri, alkanları genellikle alkollere dönüştürmek için hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizleyerek alkanların enzimatik olarak parçalanmasını gerçekleştirirler⁽²⁷⁾. Bu enzim ailesinin iki önemli üyesi, integral membran alkan 1-monooksijenaz (AlkB) ve sitokrom P450 CYP153 enzimleri, kısa ve orta uzun zincirli alkanların ayrışmasında görev alırlar ve hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde bulunabilirler^(28,29). Bu açıdan, çeşitli *Acinetobacter* suşlarının farklı alkan moleküllerini parçalayabildiği bilinmektedir^(30,31). Örneğin; *Acinetobacter oleivorans* DR1 suşunun genomunda iki *alkB*, *almA* ve *ladA* kopyasına sahip olduğu tespit edilmiştir⁽³²⁾. *Acinetobacter* sp. M1, hem *AlkB* ile ilişkili iki hidroksilazı hem de uzun zincirli alkanları oksitleyen bir dioksijenazı içerir⁽³³⁾. *P. aeruginosa* PAO1 ve RR1 suşlarının C12-C16 alkanları oksitleyen membrana entegre non-heme diiron monooksijenazları kodlayan iki alkan hidroksilaz genine (*AlkB1* ve *AlkB2*) sahip olduğu bulunmuştur^(27,33).

Sonuç olarak; doğada bazı mikroorganizmalar çeşitli metabolik işlevlere sahiptir. Birçoğu da ortamlardan

belirli kirleticileri uzaklaştırabilirler. Özellikle belirli bir mikrobiyal konsorsiyumlar kullanarak çeşitli hidrokarbonların giderimi mümkündür. Mikrobiyal konsorsiyumlar bu hidrokarbonları uzaklaştırmak için bir dizi metabolik yola sahip olduklarından sinerjik olarak işbirliği yapabilirler. Bu sebeple, yerel mikroorganizmaları hızlandırdığı veya geliştirdiği için kirleticileri kontamine alanlardan uzaklaştırmanın etkili bir yoludur⁽³⁴⁾. Ayrıca, saf mikrobiyal kültürlerle kıyasla mikrobiyal konsorsiyumlar daha etkili bir biyolojik iyileştirme/yağ bozunma potansiyeline sahiptirler⁽³⁵⁾. Bu çalışma ile CT1 konsorsiyumundaki bakteriler ile dizel yağının neredeyse tamamını bozundurmıştır. Bu şekilde izole ve karakterize edilen bakteriler; kirlenmiş toprakların çevre dostu bir şekilde iyileştirilmesi için umut verici bir çözüm olarak hizmet edebilirler. Dizel yağı biyoparçalanması, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak ve çevresel etkileri azaltmak için önemli bir adım olabilir. Bu nedenle, bu alanda yapılan ilerici çalışmalar, sürdürülebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Biyoteknolojik yöntemler kullanarak mikroorganizmaların dizel yağı parçalama yeteneklerini artırılabilir. Örneğin, gen mühendisliği veya enzim mühendisliği gibi yöntemlerle mikroorganizmaların performansını optimize edilebilir. Bu tür çalışmalar, çevre koruma ve sürdürülebilirlik açısından önemli katkılar sunabilirler.

Teşekkür: Laboratuvar altyapısının kullanımına olanak sağladığı için Prof. Dr. Güven Özdemir'e teşekkür ederim.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Bu araştırma için herhangi bir dış finansman alınmadığı bildirilmiştir.

Acknowledgment: I would like to thank Prof.Dr. Güven Özdemir for allowing the use of the laboratory infrastructure.

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

Funding: Declared as "This research received no external funding".

KAYNAKLAR

1. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol Res Int*. 2011;2011:941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
2. Xue J, Yu Y, Bai Y, Wang L, Wu Y. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Curr Microbiol*. 2015;71(2):220-8. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-7>
3. Bachmann RT, Johnson AC, Edyvean RGJ. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2014;86(Part C):225-37. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>
4. Onur G, Yilmaz F, Içgen B. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and characterization of its emulsification ability. *J Surfact Deterg*. 2015;18:707-17. <https://doi.org/10.1007/s11743-015-1697-3>
5. Dixit H, Madan L, Umema M, et al. Screening and identification of diesel oil degrading bacterial isolates from petroleum contaminated soil of Barmer. *J Pharm Chem Biol Sci*. 2018;6(1):34-40.
6. Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol*. 2017;223:277-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
7. Rojo F, editor. *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids*. Cham: Springer International Publishing; 2019.
8. Xu X, Liu W, Tian S, et al. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Front Microbiol*. 2018;9:2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
9. De Souza Pereira Silva D, de Lima Cavalcanti D, de Melo EJV, et al. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2015;97:85-9. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.09.021>
10. Vural C, Diallo MM, Ozdemir G. Assessment of *Comamonas testosteroni* strain PT9 as a rapid phthalic acid degrader for industrial wastewaters. *J Basic Microbiol*. 2022;62(3-4):508-17. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100258>
11. Diallo MM, Vural C, Şahar U, Ozdemir G. Kurstakin molecules facilitate diesel oil assimilation by *Acinetobacter haemolyticus* strain 2SA through overexpression of alkane hydroxylase genes. *Environ Technol*. 2021;42(13):2031-45. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1689301>
12. Diallo MM, Vural C, Cay H, Ozdemir G. Enhanced biodegradation of crude oil in soil by a developed bacterial consortium and indigenous plant growth promoting bacteria. *J Appl Microbiol*. 2021;130(4):1192-207. <https://doi.org/10.1111/jam.14848>
13. Shoaib M, Muzammil I, Hammad M, Bhutta ZA, Yaseen I. A mini-review on commonly used biochemical tests for identification of bacteria. *Int J Res Publ*. 2020;54(1). <https://doi.org/10.47119/IJRP100541620201224>
14. Uzunbayır-Akel N, Tekintaş Y, Yılmaz FF, et al. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının virülans özellikleri ve epidemiyolojik ilişkisi. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2019;76(4):395-404. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.68235>
15. Nikhil T, Deepa V, Rohan G, Satish B. Isolation, characterization and identification of diesel engine oil degrading bacteria from garage soil and comparison of their bioremediation potential. *Int Res J Environment Sci*. 2013;2(2):48-52.
16. Morales-Guzmán G, Ferrera-Cerrato R, Rivera-Cruz MDC, et al. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Appl Soil Ecol*. 2017;121:127-34. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.003>
17. Demeter MA, Lemire JA, Mercer SM, Turner RJ. Screening selectively harnessed environmental microbial communities for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in moving bed biofilm reactors. *Bioresour Technol*. 2017;228:116-24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.086>
18. Dörr De Quadros P, Cerqueira VS, Cazarolli JC, et al. Oily sludge stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016;115:90-101. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.018>
19. Koolivand A, Godini K, Saeedi R, Abtahi H, Ghamari F. Oily sludge biodegradation using a new two-phase composting method: kinetics studies and effect of aeration rate and mode. *Process Biochem*. 2019;79:127-34. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.003>
20. Yadav AK, Manna S, Pandiyan K, et al. Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. *Microbiology*. 2016;85:56-62. <https://doi.org/10.1134/S0026261716010161>
21. Raju MN, Leo R, Herminia SS, Morán REB, Venkateswarlu K, Laura S. Biodegradation of diesel, crude oil and spent lubricating oil by soil isolates of *Bacillus* spp. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017;98(5):698-705. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2039-0>

22. Ibrahim HMM. Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. 3 Biotech. 2016;6(2):226. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0540-5>
23. Van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil Gas Sci Technol. 2003;58(4):427-40. <https://doi.org/10.2516/ogst:2003026>
24. Boonmak C, Takahashi Y, Morikawa M. Cloning and expression of three *ladA*-type alkane monooxygenase genes from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23. Extremophiles. 2014;18(3):515-23. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0636-y>
25. Feng L, Wang W, Cheng J, et al. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(13):5602-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609650104>
26. Rosenberg M, Rosenberg E. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. J Bacteriol. 1981;148(1):51-7. <https://doi.org/10.1128/jb.148.1.51-57.1981>
27. Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes. In: Timmis KN, editor. Handb Hydrocarb Lipid Microbiol. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010:781-97.
28. Ji Y, Mao G, Wang Y, Bartlam M. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. Front Microbiol. 2013;4:58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00058>
29. Maier T, Förster H-H, Asperger O, Hahn U. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. Biochem Biophys Res Commun. 2001;286(3):652-8. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5449>
30. Throne-Holst M, Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, Zotchev SB. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. Appl Environ Microbiol. 2007;73(10):3327-32. <https://doi.org/10.1128/AEM.00064-07>
31. Jung J, Baek J-H, Park W. Complete genome sequence of the diesel-degrading *Acinetobacter* sp. strain DR1. J Bacteriol. 2010;192(18):4794-5. <https://doi.org/10.1128/JB.00722-10>
32. Kang Y-S, Jung J, Jeon CO, Park W. *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. J Microbiol. 2011;49(1):29-34. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0315-y>
33. Park C, Shin B, Jung J, Lee Y, Park W. Metabolic and stress responses of *Acinetobacter oleivorans* DR 1 during long-chain alkane degradation. Microb Biotechnol. 2017;10(6):1809-23. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12852>
34. Vural C. A brief perspective on hydrocarbon degradation: Microbial factors and role of bacteria-hydrocarbon interactions in bioremediation. Interdiscip Basic Sci Res Approaches. Lithuania: SRA Academic Publishing; 2022:41-62.
35. Canul-Chan M, Sánchez-González M, González-Burgos A, Zepeda A, Rojas-Herrera R. Population structures shift during the biodegradation of crude and fuel oil by an indigenous consortium. Int J Environ Sci Technol. 2018;15:1-16. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1362-7>

Yetişkin Bir Hastada *Streptococcus agalactiae* Nedenli Yumuşak Doku Enfeksiyonu ve Sonrasında Gelişen Bakteriyemi Olgusu

A Case of Soft Tissue Infection Caused by *Streptococcus agalactiae* and Subsequent Bacteremia in an Adult Patient

Merve Cihan*, Emel Duyar**

* Ordu Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ordu, Türkiye

** Ordu Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ordu, Türkiye

Atf/Cite as: Cihan M, Duyar E. Yetişkin bir hastada *Streptococcus agalactiae* nedenli yumuşak doku enfeksiyonu ve sonrasında gelişen bakteriyemi olgusu. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):287-290.

Öz

Grup B streptokok olan *Streptococcus agalactiae*, genellikle ürogenital ve gastrointestinal kanallarda kolonize olur. Yenidoğan menenjitinin başlıca etken ajanlarından biridir. Bununla birlikte, yetişkinler arasında *S. agalactiae* kaynaklı invaziv enfeksiyonlar giderek artan sıklıkta görülmekte ve pediatrik popülasyona kıyasla daha yüksek mortalite ile seyretmektedir. *Streptococcus agalactiae* enfeksiyonları, hamilelik sırasında yetişkinlerde, yeni doğum yapmış kadınlarda ve devam eden sağlık sorunları olan bağışıklık sistemi baskılanmış yetişkinlerde daha sık görülür. Çalışmamızda diabetes mellitus ve kronik böbrek yetmezliği tanısı olan yetişkin bir hastada, *S. agalactiae*'nin etken olduğu travma kaynaklı yumuşak doku enfeksiyonu sonrası gelişen bir bakteriyemi olgusu sunuldu. Çalışmamızın amacı kronik hastalığı olan immünsüprese yetişkin hastalarda sıklığı artan *S. agalactiae*'nin etken olduğu invaziv enfeksiyonlara dikkat çekmek ve farkındalık oluşturmaktır.

Anahtar kelimeler: *Streptococcus agalactiae*, invaziv streptokokal enfeksiyonlar, bakteriyemi, yumuşak doku enfeksiyonu

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae, a group B streptococcus, frequently colonizes the urogenital and gastrointestinal tract and is known to be one of the main etiologic agents of neonatal meningitis. Invasive infections caused by *S. agalactiae* are increase among adults with a higher mortality rate compared to the pediatric population. *Streptococcus agalactiae* infections are more common in adults during pregnancy, in women who have just given birth, and in immunocompromised adults with ongoing health problems. We report a case of bacteremia following trauma-induced soft tissue infection caused by *S. agalactiae* in an adult patient with diabetes mellitus and chronic renal failure. The aim of our study is to draw attention about invasive infections caused by *S. agalactiae*, which are increasing in frequency in immunosuppressed adult patients.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, invasive streptococcal infections, bacteremia, soft tissue infection

Alındığı tarih / Received:

16.08.2023 / 16.August.2023

Kabul tarihi / Accepted:

29.10.2023 / 29.October.2023

Yayın tarihi / Publication date:

08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

M. Cihan 0000-0002-0075-051X

E. Duyar 0009-0004-2389-4569

✉ mervecihan54@hotmail.com

GİRİŞ

Streptococcus agalactiae, B grubu gram pozitif bir streptokok olup kanlı agar besiyerinde beta hemolitik koloniler oluşturur. CAMP testi pozitif olan *S. agalactiae* sıklıkla ürogenital ve gastrointestinal sistemde kolonizasyon gösterir⁽¹⁾. Yenidoğan menenjitinin başlıca etiyolojik ajanlarından biri olarak bilinir⁽²⁾. Bununla birlikte, yetişkinler arasında

GBS invaziv enfeksiyonları giderek artan sıklıkta görülmektedir^(3,4). Pediatrik popülasyona kıyasla daha yüksek mortalite ile seyretmektedir⁽⁵⁾. Yetişkinlerde bu enfeksiyonlar gebe, yeni doğum yapmış kadınlarda ve kronik hastalığı olan immünsüprese yetişkinlerde daha sık görülmektedir⁽⁶⁾. Enfeksiyonun en çok görüldüğü yerler deri, yumuşak doku, kemik, eklemler, periton, solunum sistemi ve ürogenital sistemdir. Endokardit nadir ancak kaynağı bilinmeyen bakteriyemi sık görülmektedir⁽⁷⁾.

Bu olgu sunumunda, *S. agalactiae*'nin etken olduğu ve uygun antibiyoterapi ile başarılı şekilde tedavi edilen travma kaynaklı yumuşak doku enfeksiyonu sonrası gelişen bir bakteriyemi olgusu sunulmaktadır.

OLGU

Bilinen diabetes mellitus ve kronik böbrek yetmezliği tanısı olan 62 yaşındaki erkek hasta yüksek ateş şikayetiyle acil servise başvurdu. Hastanın başvuru anındaki laboratuvar test sonuçları; üre 113 mg/dl, kreatinin 5.51 mg/dl, C-reaktif protein (CRP) 280.67 mg/dl, lökosit sayısı $11.97 \times 10^3/\mu\text{l}$, hemoglobin 8.8 g/dl, nötrofil sayısı $9.42 \times 10^3/\mu\text{l}$, nötrofil oranı %78.6, lenfosit sayısı $0.8 \times 10^3/\mu\text{l}$, eritrosit sedimentasyon hızı 113 mm/saat ve prokalsitonin 33.1 ng/ml idi; karaciğer fonksiyon testleri normal aralıktaydı.

Enfeksiyon servisine yatırılan hastanın mikrobiyolojik tanı amacıyla iki farklı damarından birer set (bir set; bir aerob ve bir anaerob olmak üzere iki şişeden oluşacak şekilde toplam dört şişe) kan kültürü alındı. Hastaya bakteriyemi ön tanısıyla ampirik olarak intravenöz piperasilin-tazobaktam ve teikoplanin tedavisi başlandı.

Yatışının üçüncü günü, altı gün önce sırtını sert bir cisme çarptığını ve devam eden sırt ağrısı olduğu ifade eden hastanın fizik muayenesinde sırta sol skapula altında fluktuasyon veren ağrılı alan görüldü. Abse ön tanısıyla yüzeysel doku ultrasonu istenen hastanın sol posterior torakal bölgesinde kosta komşuluğunda 45x15 mm boyutlarında yoğun içerikli enfekte kistik lezyon ve kot fraktürü izlendi. Hastanın sırt bölgesindeki lezyon yerindeki hematoma ile uyumlu olan içerikten 1 ml aspire edilerek mikrobiyolojik tanı amacıyla abse kültürü alındı.

Bakteriyemi ön tanısıyla ampirik olarak intravenöz piperasilin-tazobaktam (4.5 gr, 3x2.25) ve teikoplanin tedavisi (400 mg 12 saat arayla 3 doz daha sonra 400 mg 72 saatte 1 şekilde) başlanan ve altı gün tedavisine devam edilen hastanın BD BACTEC™ FX (Becton Dickinson, ABD) tam otomatik kan kültürü sisteminde inkübe edilen tüm kan kültürlerinde

ve abse kültüründe *S. agalactiae* üredi. *S. agalactiae* için antibiyotik duyarlılık testi Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) rehberi esas alınarak disk difüzyon yöntemiyle çalışılacağı için benzilpenisilin için inhibisyon zon çapı ≥ 18 mm ölçüldüğünde fenoksimetilpenisilin ve izoksazolilpenisilin hariç tüm penisilin grubuna duyarlı, < 18 mm dirençli; levofloksasilin ≥ 50 mm duyarlı, < 17 mm dirençli; vankomisin ≥ 13 mm duyarlı, < 13 mm dirençli; teikoplanin ≥ 15 mm duyarlı, < 15 mm dirençli; eritromisin ≥ 21 mm duyarlı, < 21 mm dirençli; klindamisin ≥ 17 mm duyarlı, < 17 mm dirençli; tetrasiklin ≥ 23 mm duyarlı, < 23 mm dirençli; linezolid ≥ 19 mm duyarlı, < 19 mm ise dirençli kabul edildi⁽⁸⁾. Hastanın Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle çalışılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda bakterinin vankomisin, teikoplanin, benzilpenisilin, tetrasiklin ve linezolidde duyarlı iken eritromisin, klindamisin ve levofloksasine dirençli olduğu saptandı.

Abse ve kan kültürlerinde *S. agalactiae* üremesi ve antibiyotik duyarlılık testi sonucunda bakterinin benzilpenisiline duyarlı olması nedeniyle hastanın tedavisi intravenöz ampisilin-sülbaktam olacak şekilde yeniden düzenlendi. İntravenöz tedavi ile sekiz gün daha takip edilen hastanın lökosit sayısı ve CRP değerlerinde düzelme görüldü. Hasta oral ampisilin-sülbaktam reçetesiyle bir hafta sonra kontrole çağırılarak taburcu edildi. Oral antibiyotik tedavisine iki hafta daha devam edilen hastanın kontrollerde semptomlarının düzeldiğinin görülmesi üzerine tedavisi sonlandırıldı.

TARTIŞMA

Yetişkinlerde *S. agalactiae* enfeksiyonu gebelerde, yeni doğum yapmış kadınlarda ve kronik hastalığı olan immünsüprese yetişkinlerde daha sık görülmektedir⁽⁶⁾. *S. agalactiae* kaynaklı invaziv enfeksiyonu olan ve gebe olmayan yetişkin hastaların yüzde doksanında diabetes mellitus, karaciğer sirozu, kronik böbrek yetmezliği, kalp yetmezliği, solunum sistemi hastalığı ve malignite gibi immünsüpresyon yapan en az bir kronik hastalık mevcuttur⁽⁹⁾.

Ülkemizden bildirilen bir olgu sunumunda akut menenjit tanısıyla yatırılan, 65 yaşında ve kronik böbrek yetmezliği tanısı bulunan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve iki ayrı kan kültüründe *S. agalactiae* izole edilen kadın hasta sunulmuştur. İleri yaş grubunda gelişen *S. agalactiae* menenjitinde mortalite oldukça yüksek oranda bildirilmektedir ve bu olguda da hasta kaybedilmiştir⁽¹⁰⁾. Batista ve Ferreira⁽¹¹⁾ tarafından bildirilen bir olgu sunumunda ise daha önce hipertansiyon, diabetes mellitus ve alkolik karaciğer sirozu tanısı olan 56 yaşında erkek hasta sunulmuştur. BOS, kan ve idrar kültürlerinde *S. agalactiae* izole edilen hasta kaybedilmiştir. Tayvan'ın güneyindeki bir tıp merkezinde yapılan çalışmada *S. agalactiae*'nin etken olduğu yumuşak doku enfeksiyonu geçiren 71 hasta incelenmiştir⁽¹²⁾. Mortalite oranı %7'dir ve hastaların %11'i geniş doku nekrozunu takiben ekstremitelerini kaybetmiştir. Amputasyon gerekenlerin daha çok ileri yaş, kutanöz ülserasyon ve polimikrobiyal enfeksiyonlu hastalar olduğu görülmüştür. *Streptococcus pyogenes*'in neden olduğu enfeksiyonlarda olduğu gibi invaziv *S. agalactiae* yumuşak doku enfeksiyonlarının da gebe olmayan yetişkinlerde önemli morbidite ve mortaliteye yol açabileceği sonucuna varılmıştır. Tüm izolatların benzilpenisilin, sefotaksim, ofloksasin ve vankomisine duyarlı olduğu; izolatların %95'inin tetrasikline dirençli olduğu ve bu verilerin ışığında penisilin grubu ilaçların tercih edildiği belirtilmiştir.

Tayland'da yapılan bir çalışmada *S. agalactiae*'nin etken olduğu invaziv enfeksiyon gelişen 224 hastanın %75.9'unda bakteriyemi, tüm hastaların %80'inde eşlik eden kronik hastalık olduğu dikkat çekmiştir⁽¹³⁾. Olguların %30.8'inin deri ve yumuşak doku enfeksiyonu, %21.4'ünün septik artrit, %21'inin primer bakteriyemi ve %7.1'inin menenjit şeklinde olduğu görülmüştür. Toplam 30 günlük mortalite %11 bulunmuştur. Kaybedilen hastaların ileri yaş ve kronik hastalığa sahip olması dikkat çekmiştir. Çalışmada seftriakson, tüm klinik sendromlar için hem ampirik hem de kesin tedavide en sık kullanılan antibiyotik olmuş; antibiyotik duyarlılık testi yapılmamıştır. Bunun gerekçesinin, *S. agalactiae*'nin penisilinlere nadiren dirençli olması ve penisilin veya ampisilin direnci için rutin testlerin şu anda önerilmemesi olduğu savunulmuştur.

Penisilin direnci *S. agalactiae*'da çok nadir görülmektedir. Ancak, çalışmamızda eritromisin, klindamisin ve levofloksasine karşı saptadığımız direnç, penisilin alerjisi olan hastalarda profilaksi ve tedavi amacıyla bu antimikrobiyal ajanların kullanılacağı durumlarda dikkatli olunması gerektiğini ve kliniğe rehberlik edip ilaç direnç profilini belirlemek için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasının önemini göstermektedir. Maddi sorunlar nedeniyle antibiyotik duyarlılık testlerinin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri ölçülerek yapılamamış olması ve hastadan elde edilen *S. agalactiae* izolatının kaynağının tespit edilememesi çalışmamızın kısıtlılıklarıdır.

Olgumuzda intravenöz tedavi ile toplam 14 gün takip edilen hastamızın lökosit ve CRP değerlerinde düzelme görülmüş; hasta taburcu edilmiştir. Olgumuzda tedaviye yanıt alınmış olması ve hastanın semptomlarının düzelmesi yüz güldürücüdür. Kronik hastalığı olan immünsüprese kişilerde sıklığı artan ve mortalitesi yüksek seyreden *S. agalactiae* kaynaklı invaziv enfeksiyonlar için farkındalığın artması gerekmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infect Dis. 2014;14:323. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-323>
2. Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, et al. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. N Engl J Med. 2011;364(21):2016-25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005384>
3. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. JAMA. 2008;299(17):2056-65. <https://doi.org/10.1001/jama.299.17.2056>

4. Farley MM. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin Infect Dis. 2001;33(4):556-61.
<https://doi.org/10.1086/322696>
5. Skoff TH, Farley MM, Petit S, et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. Clin Infect Dis. 2009;49(1):85-92.
<https://doi.org/10.1086/599369>
6. Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. Vaccine. 2013;31(Suppl 4):D7-12.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.009>
7. Oyanguren B, Esteban L, Guillan M, et al. Central nervous system involvement in adult patients with invasive infection caused by *Streptococcus agalactiae*. Neurologia. 2015;30(3):158-62.
<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2013.12.002>
8. Testing TCoAS. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 2023 version 13.1. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf] (Erişim tarihi: 23 Ağustos 2023).
9. Domingo P, Barquet N, Alvarez M, Coll P, Nava J, Garau J. Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. Clin Infect Dis. 1997;25(5):1180-7.
<https://doi.org/10.1086/516094>
10. Harman R, İnan D, Öztürk F, Turhan Ö, Yalçın AN. Yetişkin bir hastada *Streptococcus agalactiae* menenjit. ANKEM Derg. 2004;18(4):234-6.
11. Batista RP, Ferreira CR. *Streptococcus agalactiae* septicemia in a patient with diabetes and hepatic cirrhosis. Autops Case Rep. 2015;5(4):35-43.
<https://doi.org/10.4322/acr.2015.028>
12. Lee NY, Yan JJ, Wu JJ, Lee HC, Liu KH, Ko WC. Group B streptococcal soft tissue infections in non-pregnant adults. Clin Microbiol Infect. 2005;11(7):577-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01186.x>
13. Phoompoung P, Pirogord N, Leelaporn A, Angkasekwinai N. Incidence of invasive Group B Streptococcus (iGBS) infections and the factors associated with iGBS mortality in adults during 2013-2017: a retrospective study at Thailand's largest national tertiary referral center. Ann Med. 2021;53(1):715-21.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1930138>

YAZARLARA BİLGİ

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

Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Tüm yazarların ORCID numaraları başvuru esnasında on-line olarak ilgili alana eklenmelidir. ORCID ID kaydı için <https://orcid.org> adresini kullanınız. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve teklif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak sisteme yüklenmesi veya posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.
- İnsanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalarla ilgili olarak etik kurulların onaylarının ve gönüllülerden alınmış yazılı onam formlarının da on-line olarak sisteme yüklenmesi ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.

Prof. Dr. Çağrı Ergin

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Kınıklı Kampüsü / Denizli

Tel: 0258 296 2491

E-posta: tmcdeditor@gmail.com

Metin Çeşitleri

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

Metin yazımı esnasında uyulacak kurallar

- Yazının Türkçe başlığı kısa, açık ve içeriği tam yansıtır olmalıdır.
- Yabancı dilde başlık Türkçe başlık ile birebir uyummalıdır.
- 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 kullanılmalıdır. Negatif / pozitif kelimeleri açık olarak yazılmalı; (-) veya (+) kısaltmaları kullanılmamalıdır.

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

Örnekler

A. Makaleler

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

- **Standart Dergi Makalesi:** 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. Internet 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 floreson antikor (DFA) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile karşılaştırılması [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 1998.

C. Sanal Ortam

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

Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler Arap rakamları ile numaralandırılmalı ve yazı içinde geçtiği yerler belirtilmelidir.
- Tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne, sol kenardan başlanarak yazılmalı ve tablo sıra numarasından sonra nokta kullanılmalıdır. Örneğin; Tablo 1. 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 zorundadırlar. 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.
- Makaleye ilişkin 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 yürütmek gibi rol ve yükümlülükleri yerine getirmek zorundadırlar.
- Editörler, makalelerin içerik ve yayın sürecindeki kalitesinden sorumlu olup hatalı durumlarda gerekli düzeltmelerin yapılmasını sağlar.
- Editörler, hakemlerin, çalışmaları 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 görsellere 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 ilkelere 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.

Yayının 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 gütmeden 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 de değerlendirmesini 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 değerlendirmesi

- 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.

