

Cilt / Volume 55

Sayı / Number 1

Mart / March 2025

ISSN 0258-2171  
e-ISSN 2458-7516



# Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

*Journal of Turkish Society of Microbiology*

- ✓ Sucul Ekosistemlerde ve Su Ürünlerinde *Clostridioides difficile* Riski: Tek Sağlık Yaklaşımı
- ✓ İmipenemin *Esherichia coli* Gen İfadesi Profiline Kısa ve Uzun-Dönemli Etkilerinin Belirlenmesi
- ✓ SARS-CoV-2 Saptanmasında Real-time PCR: Kullanılan Kit ve Cihaza Göre Değişen Performans
- ✓ İnfluenza B Virüslerinin Epidemiyolojisinde Demografi, Antijenik Özellikler ve Filogenetik İlişkilerin Bağlantısı

ISSN 0258-2171  
e-ISSN 2458-7516

---

---

# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

*JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY*

---

---



**Cilt / Volume 55**

**Sayı / Number 1**

**Mart / March 2025**



# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

## JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 55 Sayı / Number 1 Mart / March 2025

### 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

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

**Özgür Kurt;** Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
0000-0001-5575-588X

**Gürhan Çiftçiöglü;** İstanbul Kültür Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul  
0000-0002-5584-517X

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

**Serap Süzük Yıldız;** Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı,  
Ankara  
0000-0002-4820-6986

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

**Aylin Üsküdar Güçlü;** Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
0000-0002-1872-028X

**Taylan Bozok;** Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin  
0000-0002-7094-4838

### 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  
yılıda 4 kez yayınlanır.*

© 2025. 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.

© 2025. Rights to the use and reproduction, including in the electronic media, of all communications, papers, photographs and illustrations appearing in this journal belong to Turkish Society of Microbiology. Reproduction without prior written permission of part or all of any material is forbidden. The journal complies with the Professional Principles of the Press.

**Yayın Türü:** Yaygın Süreli

### Yayıncılık Hizmetleri / Publishing Services

Akdema Bilişim Yayıncılık ve Dan. Tic. Ltd. Şti.  
Adres: Kızılay Mah. GMK Bulvarı No: 23/8 Çankaya/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: İvedik OSB Mah. Melih Gökçek Blv. Yakın Plaza No: 125/E  
Yenimahalle/Ankara  
Sertifika no: 47644  
Tel: +90 312 473 92 97  
Web: www.printandsmile.com.tr

**Danışmanlar Kurulu / Advisory Board**

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

**Aycan Gündoğdu**, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri  
**0000-0003-2806-8464**

**Banu Bayraktar**, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli  
Hamidiye Etfal Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
**0000-0002-3128-0581**

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

**Bedia Dinç**, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara  
Şehir Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
**0000-0001-8318-2556**

**Bülent Bozdoğan**, Aydın Adnan Menderes, Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın  
**0000-0003-2469-9728**

**Bilal Olcay Peker**, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk  
Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
Laboratuvarı, İzmir  
**0000-0001-8735-2962**

**Burcu İrem Omurtag Korkmaz**, Marmara Üniversitesi,  
Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Anabilim  
Dalı, İstanbul  
**0000-0001-7918-6212**

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

**Didem Üçok**, İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi,  
Su Ürünleri İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul  
**0000-0003-0162-4731**

**Ebru Us**, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
**0000-0001-9705-1792**

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

**Ezgi Gülten**, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon  
Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
**0000-0003-0248-7716**

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

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

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

**İdil Can Tunçelli**, İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri  
Fakültesi, Su Ürünleri İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı,  
İstanbul  
**0000-0002-9999-6658**

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

**İpek Mumcuoğlu**, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara  
Şehir Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara  
**0000-0002-6392-8880**

**Mehmet Soylu**, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir  
**0000-0002-9145-1506**

**Meryem Güvenir**, Kıbrıs Sağlık ve Toplum Bilimleri  
Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bölümü, Güzelyurt,  
KKTC  
**0000-0003-4109-654X**

**Pınar Çıragil**, Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul  
**0000-0001-6131-0940**

**Selçuk Kaya**, Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir  
**0000-0002-8637-6345**

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

**Yeşim Tuyji Tok**, Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir  
**0000-0003-4970-9216**





## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### DERLEME / REVIEW

- **Sucul Ekosistemlerde ve Su Ürünlerinde *Clostridioides difficile* Riski: Tek Sağlık Yaklaşımı**  
*Risk of Clostridioides difficile in Aquatic Ecosystems and Aquaculture: One Health Approach*  
Melike Nur Tosun Demir, Gizem Taylan Yalçın, Nükhet Nilüfer Demirel Zorba ..... 1-17
- **Tehditlere Karşı Savaş: Bakteriler Kendilerini Nasıl Savunur? Sistemik Derleme**  
*Fighting against the Threats: How do Bacteria Defend Themselves? A Systematic Review*  
Can Berk Kurt, Gönül Aslan ..... 18-26

### ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / RESEARCH ARTICLES

- **İmipenemin *Escherichia coli* Gen İfadesi Profiline Kısa ve Uzun-Dönemli Etkilerinin Belirlenmesi**  
*Evaluation of Short- and Long-term Effects of Imipenem on Gene Expression Profile in Escherichia coli*  
Hüseyin Özgür Özdemirel, Sibel Küçükylıdırım ..... 27-34
- **İnsan Papilloma Virüsünü (HPV) Anlamak: HPV'nin Bilinen Bilinmeyenleri**  
*Understanding Human Papillomavirus (HPV): The Known Unknowns of HPV*  
Özgenur Hacıoğlu ..... 35-42
- **SARS-CoV-2 Saptanmasında Real-time PCR: Kullanılan Kit ve Cihaza Göre Değişen Performans**  
*Real-time PCR detection of SARS-CoV-2: Performances Vary Based on Instrumentation and Kits*  
Hatice Albayrak, Fadile Yıldız Zeyrek, Akın Yiğit ..... 43-49
- **Gaziantep İlinde HBsAg Pozitif Hastalarda HDV Seroprevalansı**  
*HDV Seroprevalence in HBsAg Positive Patients in Gaziantep Province*  
Kaan Çeylan, Tekin Karşılığil ..... 50-55
- **İki Farklı COVID-19 Aşısı Sonrası Oluşan IFN- $\gamma$  ve IgG Antikor Düzeylerinin Karşılaştırılması**  
*Comparison of IFN- $\gamma$  and IgG Antibody Levels After Two Different COVID-19 Vaccines*  
Betül Dönmez Gökboğa, Şükrü Öksüz, Emel Çalışkan, Cihadiye Elif Öztürk, Nagihan Ege, Eda Acar, Banu Hümevra Keskin ..... 56-62
- **Döner ve Salatalarda *Salmonella* spp. Araştırılması: Yanlış Pozitif Sonuçların Önemi**  
*Investigation of Salmonella spp. in Doner Kebab and Salads: Significance of False Positive Results*  
Perihan Akbaş, Çiğdem Sezer, Fatih Büyük, Gönül Damla Büyük, Eray Büyük ..... 63-72
- **İnfluenza B Virüslerinin Epidemiyolojisinde Demografi, Antijenik Özellikler ve Filogenetik İlişkilerin Bağlantısı**  
*Linking Demography, Antigenic Characteristics and Phylogenetic Relationships in the Epidemiology of Influenza B Viruses*  
Muhammet Ekin Azbazar, Zeynep Ahsen Koçer ..... 73-92



# TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

## JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / Volume 55 Sayı / Number 1 Mart / March 2025

### OLGU SUNUMU / CASE REPORT

- **Yararlı Bakteriler Fırsatçı Patojenlere Dönüşürse! Probiyotik Alımı Sonrası Gelişen *Alkalihalobacillus clausii* Sepsisi: Türkiye'den İlk Olgu Sunumu**  
*If Beneficial Bacteria Become Opportunistic Pathogens! Alkalihalobacillus clausii Sepsis That Develops After Taking Probiotics: First Case Report from Türkiye*  
Zeynep Ayaydın, Ayşe Batgı Azarkan, Özge Alkan Bilik, Mehmet Nur Talay, Nida Özcan, Ali Cem Tekin..... 93-97
- YAZARLARA BİLGİ ..... VII-VII
- ETİK POLİTİKALAR ..... IX-X
- HAKEMLERE BİLGİ ..... XI

# Sucul Ekosistemlerde ve Su Ürünlerinde *Clostridioides difficile* Riski: Tek Sağlık Yaklaşımı

## *Risk of Clostridioides difficile in Aquatic Ecosystems and Aquaculture: One Health Approach*

Melike Nur Tosun Demir\*<sup>ORCID</sup>, Gizem Taylan Yalçın\*<sup>ORCID</sup>, Nükhet Nilüfer Demirel Zorba\*<sup>ORCID</sup>

\* Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Çanakkale, Türkiye

**Atf/Cite as:** Tosun Demir MN, Taylan Yalçın G, Demirel Zorba NN. Sucul ekosistemlerde ve su ürünlerinde *Clostridioides difficile* riski: Tek sağlık yaklaşımı. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):1-17.

### Öz

Hastane kaynaklı bir patojen olarak bilinen, Gram (+), zorunlu anaerob ve sporlu bir bakteri olan *Clostridioides difficile* ile ilişkili enfeksiyonlarda, toplum kaynaklı enfeksiyonlar giderek artış göstermektedir. Bu durum, söz konusu etkenin diğer bulaşma kaynaklarının da önemsenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Artan nüfus, değişen iklim koşulları, yükselen deniz suyu sıcaklıkları, mülaj oluşumu, su kaynaklarına karışan sel suları ve kanalizasyon atıkları sucul ekosistemlerin *C. difficile* ile kirlenme olasılığını artırmaktadır. Kirlenmiş su ortamlarında bulunan su ürünleri, doğal olarak mikrobiyal kontaminasyon riski altındadır ve bu durum, halk sağlığı için büyük önem taşımaktadır. Günümüzde, *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonlarla mücadele, büyük ölçüde etkenin tanısı ve tedavisine odaklanmıştır. Tek Sağlık yaklaşımı altında etkili bir multidisipliner yaklaşım benimsemek, enfeksiyonların yönetiminde kalıcı ve çözüm odaklı adımlar atılmasını kolaylaştıracaktır. Bu derlemede, sucul ekosistemlerde ve su ürünlerinde *C. difficile* varlığı kapsamlı bir şekilde ele alınmış ve enfeksiyonların kontrolünde çevresel kaynakların önemine dikkat çekilmesi amaçlanmıştır. Böylece Tek Sağlık yaklaşımı benimsenerek, *C. difficile* enfeksiyonlarının kontrolünde etkili ve kalıcı çözümlerin geliştirilmesine katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Ayrıca *C. difficile*'nin su ürünlerinden izolasyonunda kullanılan yöntemler derlenmiş ve *C. difficile*'nin gıdalardan izolasyonunda gelecekteki araştırmacılar için önerilerde bulunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Clostridioides difficile*, su ürünleri, sucul ekosistem, tek sağlık yaklaşımı

### ABSTRACT

The increasing trend of community-acquired infections associated with *C. difficile*, a Gram (+), obligate anaerobe, and spore-forming bacterium known as a nosocomial agent, indicates the importance of considering other contamination sources of this pathogen. The growing population, changing climate conditions, rising sea temperatures, mucilage formation, flood content mixing with drinking water resources and sewage discharge increase the likelihood of *C. difficile* contamination in aquatic ecosystems. Seafood in these contaminated water environments is naturally at risk of microbial contamination, posing a significant public health concern. Currently, efforts to combat *C. difficile* infections are largely focused on diagnosis and treatment. However, adopting an effective multidisciplinary approach under the One Health perspective will facilitate the implementation of sustainable and solution-oriented measures in infection management. This review comprehensively examines the presence of *C. difficile* in aquatic ecosystems and seafood, emphasizing the importance of environmental sources in controlling infections. Thus, by adopting the One Health approach, it aims to contribute to the development of effective and sustainable solutions for controlling *C. difficile* infections. Additionally, methods used for isolating *C. difficile* from seafood are reviewed, and recommendations for future researchers on isolating *C. difficile* from food are provided.

**Keywords:** *Clostridioides difficile*, seafood, aquatic ecosystem, one-health approach

### Alındığı tarih / Received:

25.06.2024 / 25.June.2024

### Kabul tarihi / Accepted:

08.11.2024 / 08.November.2024

### Yayın tarihi / Publication date:

24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

M. N. Tosun Demir 0000-0002-6451-7354

G. Taylan Yalçın 0000-0003-2146-8254

N. N. Demirel Zorba 0000-0001-6851-6474

✉ dnuhket@comu.edu.tr



## GİRİŞ

*Clostridioides difficile*, Gram (+), basil, zorunlu anaerob, toksin üreten, sporlu ve antibiyotik ile ilişkili ishale sebep olan bir bakteridir. Genellikle, antibiyotik kullanımının normal bağırsak mikrobiyotasını bozmasından sonra, insan bağırsak sisteminde kolonize olmaktadır. Bakteri kolonize olduktan sonra kalın bağırsağın epitel hücrelerine bağlanan ekzotoksinler üretmekte, toksinler hücre yapısını bozarak, sıvı kaybına ve ishal ve kolit ile sonuçlanan inflamatuvar bir yanıt oluşumuna neden olmaktadır. Bu yanıt hafif bir fokal kolit vakasından şiddetli sepsis, toksik megakolon, çoklu organ disfonksiyonu ve ölüme kadar değişkenlik göstermektedir<sup>(1)</sup>. *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonlar için risk faktörleri arasında antibiyotik kullanımı, ileri yaş ve hastane veya sağlık hizmetleri veren ortamlarda kalmanın yer aldığı belirtilmektedir. Ayrıca, yetersiz el hijyenine sahip olan sağlık çalışanları *C. difficile* taşınmasında rol oynayabilmektedir<sup>(2)</sup>. Toksinojenik *C. difficile*'nin ellerde olduğu gibi hastane yüzeylerinde de kolonize olduğu bildirilmiştir<sup>(3)</sup>. *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonlarda hastaneler yüksek riskli ortamlar olarak kabul edilmektedir. Ancak son yıllarda, gençler, çocuklar, hastanede yatış yapmamış, antimikrobiyallere maruz kalmamış veya kronik hastalıkları olmayan bireylerde *C. difficile* enfeksiyonları daha fazla bildirilmeye başlamıştır<sup>(4)</sup>. Toplum kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonlarının artan oranları, daha fazla toksin A ve B üretebilen ve bu nedenle belirgin risk faktörleri olmayan bireyleri de etkileyebilen PCR ribotip 027 veya 078 gibi hipervirülen suşların ortaya çıkması ve yayılması ile ilişkilendirilmiştir<sup>(4)</sup>. *C. difficile* epidemiyolojisi değişmeye devam ettikçe, bu patojenin çeşitli suşlarının nasıl geliştiğine, yayıldığına ve *C. difficile* enfeksiyonları (CDI)'na neden olan *C. difficile* suşlarının değişen yaygınlığına ek olarak, bulaşma kaynaklarındaki değişiminde dikkate alınması gerektiği ifade edilmektedir<sup>(5)</sup>. Sheth ve ark.<sup>(6)</sup> ile Halstead ve ark.<sup>(7)</sup> yaptıkları çalışmalarda hastaneye kabul edilen asemptomatik hastaları araştırmış ve elde edilen *C. difficile* izolatlarını, semptomatik CDI hastalarından alınan izolatlarla karşılaştırmıştır. Sonuçlar, test edilen popülasyonun %10-15'inin asemptomatik taşıyıcı olduğunu ve bunların %80'inden fazlasının toksinojenik

suşlarla kolonize olduğunu ortaya koymuştur. Lim ve ark.<sup>(8)</sup> bu çalışmaların gerçek hastane kaynaklı vakaları içermediğini ve *C. difficile*'in toplumdan edinildiğini, hastalığın ise sadece hastaneye kabul edildikten sonra ortaya çıktığını gösterdiğini ifade etmiştir. Ayrıca asemptomatik taşıyıcılar aracılığıyla *C. difficile* suşlarının sürekli olarak hastane ortamına getirilmesiyle, toplum kaynaklarının/rezervuarlarının CDI bulaşmasında önceden düşünülen çok daha büyük bir rol oynadığı ve mevcut sınıflandırma yönergeleri altında toplum kaynaklı CDI insidansının büyük ölçüde hafife alındığını bildirmişlerdir.

Dünya Sağlık Örgütü, gıda kaynaklı bir hastalığı "gıdanın yutulması yoluyla vücuda giren ajanların sebep olduğu, doğası gereği toksik veya genellikle de bulaşıcı" bir hastalık şeklinde tanımlamaktadır<sup>(9)</sup>. Bir hastanın *C. difficile*'yi direkt olarak gıdalardan alıp almadığını belirlemek için herhangi bir epidemiyolojik kılavuz olmadığından, bir *C. difficile* enfeksiyonu vakasının gıda kaynaklı olup olmadığını şu an için belirlemek kolay değildir. Ayrıca pek çok gıda kaynaklı hastalıkta, kontamine olmuş gıdanın tüketilmesinden semptomların ortaya çıkmasına kadar nispeten kısa bir süre vardır. Öte yandan, *C. difficile* daha sonraki bir tarihte kolonizasyon fırsatı ortaya çıkana kadar hastalığa neden olmayabilir. Ayrıca, bir bireyin asemptomatik olarak *C. difficile* ile kolonize olması ve ardından bakteriyi başka bir bireye geçirmesi ve semptomatik hastalık ile sonuçlanması da mümkündür. Bunun yanında *C. difficile* kolonizasyonunun fırsatçı doğası ve hastalığın ortaya çıkması için hem bakteriye maruz kalma hem de bağırsak mikrobiyotasının bozulmasına duyulan ihtiyaç, asemptomatik bir durumun öneminin belirlenmesinde zorluklar yaratmaktadır<sup>(10)</sup>. Bu sebepler ile gıdayı epidemiyolojik olarak CDI ile ilişkilendirmek oldukça zordur. Ancak gıdasından yararlanılan hayvanlardan<sup>(11)</sup>, evcil hayvanlardan<sup>(12)</sup>, su<sup>(13)</sup>, toprak<sup>(14)</sup>, ve gübre<sup>(15)</sup> gibi çevresel kaynaklardan, et<sup>(16)</sup>, tavuk eti<sup>(17)</sup>, su ürünleri<sup>(18)</sup> ve sebzeler<sup>(19)</sup> olmak üzere çeşitli gıda matrislerinden *C. difficile* izole edilmiştir. Risk faktörlerini taşımayan insanlarda da *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonların görülmesi, CDI'nda hastane dışı kaynakların rolünün düşünülmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır. Bu bulgu, araştırma yapılan nişlerde karşılaşılan seçim baskıları sonrasında, bu bakteride ortaya çıkan ve hem klinik

hem de veterinerlik ortamlarında antimikrobiyal kullanımındaki artışa bağlı olarak ortaya çıkan adaptasyonları yansıtabilir. *C. difficile* yeni ekolojik ortamlara uyum sağlamaya devam ettikçe bu cinsin taksonomisi de gelişmektedir<sup>(20)</sup>.

Atmosfer ve deniz suyu sıcaklıklarının yükselmesi, azalan kar ve buz miktarları ile yükselen deniz seviyeleri, ekstrem hava olaylarının sıklığının artması gibi iklim değişikliği sonuçlarının, gıda ve su kaynaklı enfeksiyonlarda küresel bir artışa neden olduğu belirtilmiştir<sup>(21)</sup>. Sıcaklık artışı, artan yağış ve sel olayları bakteriyel gastrointestinal enfeksiyonların yaygınlığını artırdığı ifade edilmektedir<sup>(22,23)</sup>. Lin ve ark.<sup>(24)</sup>, iklim değişikliği nedeniyle sel olaylarının artmasının, *C. difficile* enfeksiyonlarında potansiyel bir artışa yol açabileceğini belirtmiştir. İklim değişikliği, gıdaların ve bağırsak mikrobiyotasında değişikliklere neden olabilir. Bağırsaktaki azalan biyoçeşitlilik, gastrointestinal hastalıkların görülme sıklığını ve şeklini etkileyebilmektedir<sup>(23)</sup>. Küresel iklim değişikliğinin *C. difficile* enfeksiyonları üzerindeki etkisi, çeşitli faktörlerin birleşimiyle ortaya çıkmaktadır. İklim değişikliği sonucu artan yağış ve sel olayları, *C. difficile*'nin yayılma ve bulaşma riskini artıran önemli etmenlerdendir. Seller, *C. difficile* sporlarını ve potansiyel enfeksiyon kaynaklarını taşıyabilir ve bu da etkenin daha geniş alanlarda yayılmasına neden olabilir. Ayrıca, iklim değişikliğine bağlı olarak bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, CNI için bilinen bir risk faktörüdür. Dolayısıyla küresel iklim değişikliği hem çevresel hem de mikrobiyal dinamikleri değiştirerek CNI için uygun bir zemin oluşturabilir.

Daha önce yalnızca hayvanlarda görülen suşların neden olduğu insan enfeksiyonlarının ortaya çıkması, CNI'nin zoonotik olabileceğine dair kanıtlara katkıda bulunmaktadır<sup>(10)</sup>. Ancak, bu suşların genomik bilgileri, tek başına salgınları veya bulaşma zincirlerini açıklamak için yeterli değildir. Bu veriler salgınları tespit etmek ve çevresel, gıda ve klinik ortamlardan rezervuarları belirlemek için epidemiyolojik ve istatistiksel analizlerle desteklenmelidir<sup>(25)</sup>. İnsan sağlığının, hayvanların ve çevrenin sağlığıyla bağlantılı olduğunu kabul eden bir girişim olan tek sağlık yaklaşımı, *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonların yönetimi için, doktorlar, veterinerler ve tarım

uzmanları arasındaki iletişim seviyesini artırmaktır<sup>(8)</sup>. *C. difficile*'nin her ortamdan izole edilmesi tek sağlık yaklaşımını halk sağlığı planlaması açısından hayati kılmakta ve hastalığı kontrol etme, önleme ve tedavi etme girişimlerinde bir sağlık sorununa katkıda bulunan tüm faktörlerin gözden geçirilmesi ihtiyacını vurgulamaktadır<sup>(10)</sup>. Tek Sağlık yaklaşımı, CNI'nin kontrolünde insan, hayvan ve çevre sağlığını bir bütün olarak ele alarak daha entegre ve etkili çözümler sunmaktadır. Sucul ekosistemlerde *C. difficile* kontaminasyonunu ve iklim değişikliği etkilerini izlemek çevre sağlığı için, su ürünleri yetiştiriciliğinde hijyen standartlarını artırmak hayvan sağlığı açısından önemlidir. Gıda güvenliği uygulamaları ve halk sağlığı eğitimi ise insan sağlığını korumada önemli rol oynamaktadır. Sürekli izleme, biyogüvenlik önlemleri, kapsamlı araştırmalar ve güncellenmiş politika ve yönetmelikler, Tek Sağlık yaklaşımının etkinliğini artırarak *C. difficile*'nin yayılmasını önleyebilir ve sürdürülebilir halk sağlığı stratejilerini geliştirebilir.

Bu derlemede su ürünlerinde *C. difficile* varlığı, sucul ekosistemlerde *C. difficile* kontaminasyonunu artıracak faktörler ile birlikte tartışılmış ve Tek Sağlık yaklaşımıyla CNI ile mücadelede çevresel bir kaynak olarak su ürünlerindeki *C. difficile* varlığına dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

### ***Clostridioides difficile***

*Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile*, taksonomik olarak Eubacteriales takımına, *Peptostreptococcaceae* familyasına ve *Clostridioides* cinsine aittir<sup>(26)</sup>. İlk kez 1935 yılında sağlıklı bebeklerin bağırsak florasından izole edilmiştir<sup>(27)</sup>. Tanımlandığı ilk dönemlerde izolasyonunda yaşanan zorluklar sebebi ile *Bacillus difficilis* olarak adlandırılmış ve 40 yıl sonra *Clostridium difficile* olarak yeniden adlandırılarak psödomembranoz kolitin nedeni olarak tanımlanmıştır<sup>(28)</sup>. Lawson ve Rainey'nin 2015 yılındaki önerisi doğrultusunda, *Clostridium* cinsinin *C. butyricum* ve benzeri türlerle sınırlanması, bu bakterinin filogenetik olarak rRNA Clostridial Kümesi I'den uzakta olduğunu ve Küme XI'de yer aldığını göstermiştir. Ancak, bu monofiletik gruptan ayrılan *C. difficile*, belirsizliklere neden olmaktadır<sup>(29)</sup>. Bu

nedenle yapılan fenotipik, kemotaksonomik ve filogenetik analizler sonucunda<sup>(29)</sup> 2016 yılında ikinci bir yeniden sınıflandırmaya dahil edilerek *Clostridioides difficile* olarak adlandırılmıştır<sup>(30)</sup>. Ancak günümüzde *C. difficile* için her iki isimlendirmenin de kullanılabilceği ifade edilmiştir<sup>(31,32)</sup>.

*Clostridioides difficile* zorunlu anaerob, spor oluşturan, Gram (+), basil bir bakteridir<sup>(33)</sup>. Tipik kolonileri kan içeren besiyerlerinde yuvarlak, düz, kirli beyazdır ve buzlu cam görünümüne sahiptir<sup>(34)</sup>. Diğer mikroorganizmalar ile rekabetine de büyük katkı sağlayan ve yüksek düzeyde bakteriyostatik bir bileşik olan ve spesifik at gübresi kokusuna sebep olan *p*-cresol sentezleyebildiği ve tolere edebildiği bildirilmiştir<sup>(35)</sup>. Çevresel kaynaklarda, insan ve hayvan dışısında toksinojenik ve toksinojenik olmayan formda yaygın olarak normal bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak bulunabilen bu bakteri fekal-oral yol ile taşınmaktadır<sup>(27)</sup>.

Nozokomiyal ishalin en yaygın nedeni olan bu bakterinin görülme sıklığının, 2000 yılında hipervirulent bir suşun ortaya çıkmasından bu yana, giderek artış gösterdiği bildirilmektedir<sup>(28)</sup>. CNI'nun tanısı ve tedavisi; sınırlı tedavi seçenekleri, yaygın eşlik eden hastalıklar gibi nedenlerde oldukça zordur ve sıklıkla tekrarlayan enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir<sup>(36)</sup>.

### ***Clostridioides difficile* patojenitesi**

Gastrointestinal sistem, karmaşık bir ekosistemdir. *C. difficile*, sağlıklı kişilerin yaklaşık %1 ila %15'inde bağırsakları kolonize etmektedir. Yeni doğanlarda ise bu oran %80'e kadar çıkabilmektedir ancak nadiren enfeksiyona neden olmaktadır<sup>(37)</sup>. Bu patojen mikrobiyotanın bozulmasından sonra insan bağırsağında gelişmekte ve gastrointestinal sorunlara yol açabilmektedir<sup>(38)</sup>. CDI'nın sağlık sistemleri için büyük bir yük oluşturduğu ve hastanelerde salgınlara neden olduğu ifade edilmiştir<sup>(39)</sup>.

Hipervirulent RT027 *C. difficile* suşunun florokinolon direnci kazanması ile birlikte Avrupa'da farklı ülkelerde<sup>(40)</sup> ve Kuzey Amerika<sup>(41)</sup>'da çeşitli salgınlara

neden olduğu belirlenmiştir. Çeşitli ülkelerde *C. difficile* enfeksiyonlarının yıllara bağlı olarak yükselen insidansları bildirilmiştir<sup>(42-44)</sup>. ABD'de yaygın olarak bulunan suşlar arasında RT027, RT106, RT014/20 ve RT002 bulunmaktadır. Hipervirulent suşlar arasında RT027'nin yanı sıra, daha düşük yaygınlık oranına sahip olan RT078 ve RT244 de mevcuttur. RT017 suşu Asya ve Afrika'daki CDI salgınlarının ana nedeni olarak ortaya çıkmaktadır. Farklı coğrafik bölgelerde görülen farklı *C. difficile* ribotip türleri, dünya genelinde ortaya çıkmaya devam ederek CDI'yu küresel bir sorun haline getirmektedir<sup>(45,46)</sup>.

*Clostridioides difficile* enfeksiyonlarının patogeneziindeki ilk adımlardan biri olan kolonizasyon, *C. difficile* sporlarının alınmasıyla başlar ve genellikle antibiyotik tedavisi sırasında meydana gelir. Sporlar, midenin asidik ortamına dayanabilmekte ve kolona geçebilmektedir. Doğal bağırsak mikrobiyotasının antibiyotik gibi nedenlerle rekabet gücünün azalmasıyla, sporlar kolonda vejetatif hücrelere dönüşmektedir. Ardından, *C. difficile*, enterotoksin A (TcdA) ve sitotoksin B (TcdB) olarak bilinen birincil toksinleri salgılar. Bu toksinler, bağırsak hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak hücre fonksiyonunu bozmakta ve inflamatuvar yanıt ile ishali tetiklemektedir<sup>(38)</sup>.

Fırsatçı bir patojen olan *C. difficile*'nin patojenitesi ve salgın potansiyeli, virülans faktörlerine ve antibiyotik direncine dayanmaktadır<sup>(47)</sup>. *C. difficile*'nin temel virülans faktörleri, vejetatif hücreleri tarafından salgılanan toksinlerdir. Ayrıca, adhesinler, ekstrasellüler enzimler, flagella, kapsül ve parakristal S katmanı gibi diğer faktörler de virülansa katkıda bulunmaktadır<sup>(48)</sup>.

*Clostridioides difficile*'nin virülansı, başlıca iki ana toksinin (TcdA ve TcdB) üretimi ile ilişkilidir<sup>(49)</sup>. Toksin A ve Toksin B, %47 oranında aynı yapıya sahiptir. Bu toksinlerin her biri, farklı işlevleri olan dört ana bölgeden oluşur: glikosiltransferaz (A alanı), reseptör bağlanma (B alanı), sistein proteaz (C alanı) ve dağıtım (D alanı)<sup>(26)</sup>. Her iki toksin de bakteri genomundaki patojenite lokusu (*PaLoc*) adı verilen bölgede kodlanmaktadır. Toksinojenik olmayan suşlar ise, *PaLoc* lokusuna sahip değildirler ancak konjugasyon yoluyla kazanabilirler<sup>(26)</sup>.

Toksin A ve Toksin B, glukoziltransferaz yapısındadır ve Rho ve Rac ailesinin küçük GTPazlarını glikozilasyon yoluyla modifiye ederek etkisiz hale getirir. Bu, Rho'ya bağlı sinyal oluşumunu engellemektedir. Rho proteinlerinin inaktivasyonu, hücre iskeletinin yeniden yapılandırılması, inflamasyon aktivasyonu, hücre döngüsünün inhibisyonu, apoptoz veya nekroz gibi çeşitli hücrel sorunlara yol açmaktadır<sup>(33,50,51)</sup>.

TcdA ve TcdB'nin yanı sıra, *C. difficile*'nin bazı suşları, CDT lokusunda (*CdtLoc*) bulunan *cdtA* ve *cdtB* adlı iki gen tarafından kodlanan binary toksin (CDT) adlı üçüncü bir toksin üretmektedir<sup>(52,53)</sup>. Binary toksin iki ayrı protein bileşiminden oluşan bir toksindir ve bazı suşların virülansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Binary toksinin, TcdA ve TcdB'nin toksisitesini artırabildiği ve hastalığın daha şiddetli seyretmesine yol açabildiği belirtilmektedir. Bu nedenle, ek bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir<sup>(54)</sup>.

*Clostridioides difficile* enfeksiyonu genellikle toksinlerle ilişkilendirilse de, endosporlar da önemli bir virülans faktörüdür ve patojenin varlığını sürdürmesi ve enfeksiyonun tekrar etmesinden sorumlu tutulmaktadır<sup>(55)</sup>. Zorunlu bir anaerob olarak, *C. difficile*'nin hayatta kalması ve yayılması, çok katmanlı bir dış yapısı olan sporlarına bağlıdır<sup>(56)</sup>. *C. difficile*'nin bulaşması spor formunda fekal-oral yolla olmakta ve sporların vejetatif hücrelere dönüşmesi son aşamada duodenumda gerçekleşmektedir. Daha sonra bakteriler kolona ulaşır burada bir veya birkaç toksin kombinasyonu üreterek enfeksiyona neden olmaktadır<sup>(57)</sup>. Sporlar çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunmakta ve insanlar ile hayvanların dışkılarıyla yayılabilmektedir<sup>(58)</sup>.

*Clostridioides difficile* sporları, düşük su aktivitesine<sup>(59)</sup>, kimyasallara<sup>(60)</sup>, düşük ve yüksek sıcaklıklara<sup>(61,62)</sup> karşı son derece dirençlidir. Bu direnç özellikleri ile birlikte sporlar kontamine oldukları bir ortamda birkaç haftadan birkaç aya kadar varlıklarını sürdürebilmektedir<sup>(63-65)</sup>.

Flagella oluşumu, birçok bakteriye hareket etme, yüzeylerde kolonize olma, büyümeyi ve hayatta kalmayı optimize etme gibi avantajlar

sağlamaktadır<sup>(66)</sup>. Hareketliliği ve yapışmayı kontrol eden genlerin düzenlenmesi, *C. difficile*'nin kolonizasyonunu ve virülansını artırmaktadır<sup>(67)</sup>. Flagellum biyosentezinin toksin üretimi, sporülasyon, adezyon ve metabolizma gibi çeşitli hücrel süreçlerle bağlantılı olduğu bildirilmektedir<sup>(57)</sup>.

*C. difficile* yeni tanımlanan bir S katmanına sahiptir. Bu katman, birçok bakteride ve hemen hemen tüm arkelere bulunan, lizozim direnci ve bakteriyofaj yapışması gibi çeşitli aktivitelerle ilişkili bir yapıdır. S katmanı, patojen-konak etkileşimlerinde kritik bir rol oynamaktadır ve patogenezi desteklemektedir. S katmanı proteinlerinin *C. difficile*'nin hücre hatlarına tutunmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir<sup>(68)</sup>.

*Clostridioides difficile* enfeksiyonlarında suş virülansı ve konak tepkisi kritik faktörlerdir. Bağırsak mikrobiyotasının besin nişlerini işgal etme ve besin kullanımını kısıtlama yeteneği, *C. difficile* kolonizasyonunu önlemede önemli bir rol oynamaktadır. Araştırmalar, *C. difficile*'nin ihtiyaç duyduğu ekolojik nişler başka mikroorganizmalar tarafından işgal edildiğinde, patojenin rekabet edemediğini ve kolonize olamadığını göstermektedir<sup>(36,69)</sup>. *C. difficile*'nin bağırsak mukozasına tutunmasının yanında, abiyotik yüzeylerde tutunması ve biyofilm oluşturabilmesi de patojenitesinde rol oynamaktadır<sup>(70)</sup>.

### ***Clostridioides difficile* antibiyotik direnci**

Bakterilerde antibiyotik direnci, çoğalma sırasında dikey yönde (ana hücreden yeni hücrelere) genetik ve fizyolojik özellikler olarak aktarılmasının yanı sıra, bakterilerin türler ve/veya cinsler arasında yatay olarak genetik materyal alışverişi yapma eğilimi nedeniyle meydana gelebilmektedir.

*Clostridioides difficile* ile ilişkili hastalıklarda olağan tedavinin antibiyotik kullanılması olması yanında, antibiyotik maruziyeti risk faktörlerinden biridir<sup>(72)</sup>. Antibiyotik direnci *C. difficile* ile ilişkili hastalıkların yayılmasında önemli rol oynamaktadır<sup>(73)</sup>. Antibiyotik direnç oranları coğrafi bölgelere ve yerel/ulusal antibiyotik kullanım politikasına bağlı olarak

önemli ölçüde farklılık gösterse de veriler, klinik *C. difficile* izolatlarının çoğunun sefalosporinler, florokinolon, eritromisin ve klindamisine dirençli olduğunu göstermektedir<sup>(74)</sup>. *C. difficile*'deki antibiyotik direnci çok faktörlü bir yapıya sahiptir. Metabolik yollardaki varyasyonlar ve biyofilm üretimi gibi faktörlerin yanında, genetik elementlerin kazanılması ve antibiyotik hedef bölgesindeki değişiklikler, *C. difficile*'nin antibiyotik direncine katkı sağlamaktadır<sup>(74)</sup>. Orta ve şiddetli seyreden *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonlarda, tedavide ilk seçeneklerden biri olan vankomisin, hücre duvarının temel bileşeni olan peptidoglikan sentezini inhibe etmekte ve gastrointestinal sistem tarafından zayıf bir şekilde emilmektedir<sup>(74)</sup>. Tedavide kullanılan bir diğer antibiyotik olan metronidazolün CDI'nın tedavisinde vankomisine kıyasla etkinliğinin azalmasının nedenleri tam olarak belirlenememiştir. Metronidazolün etki mekanizmasının da tam olarak aydınlatılamamasının yanında DNA sentezi inhibisyonu, oksidasyon yoluyla DNA hasarı, DNA bozulmasına ve hücrenin ölümüne sebep olan tek ve çift zincirli bağların kopması ile etki oluşturduğu düşünülmektedir<sup>(75)</sup>.

Gıdalar, antimikrobiyal dirençli bakteriler ve/veya antimikrobiyal direnç genleri ile toprak, su, fekal kontaminasyon, dışkı ile kontamine olmuş sular ve kanalizasyon deşarjları gibi birçok yol ile kontamine olabilirler<sup>(76)</sup>. Tedavide sıklıkla kullanılan metronidazol<sup>(77)</sup>, klindamisin<sup>(77)</sup> ve vankomisin<sup>(78)</sup> antibiyotiklerine karşı direnç gösteren, gıdalardan elde edilen *C. difficile* izolatları bildirilmiştir.

### Sucul ekosistemlerde *Clostridioides difficile* varlığı

Sucul ekosistemlerdeki mikrobiyal kirlilik, patojenik mikroorganizmaların su ürünlerine potansiyel kontaminasyonu nedeniyle kritik sorunlardan biridir<sup>(79)</sup>. Bakteriyel düzeydeki kirlenme, atık suyun deniz kıyısına boşaltılmasından önemli seviyede etkilenmektedir<sup>(79)</sup>. *C. difficile* atık su arıtma tesislerinde varlığını koruyabilmektedir ve toksinojenik *C. difficile* çevreye salınarak toplumdan edinilen *C. difficile* enfeksiyonları için potansiyel bir kaynak haline gelmektedir<sup>(80,81)</sup>. İran'da atık su arıtma tesisinde *C. difficile* varlığını belirlemek için yapılan bir çalışmada<sup>(80)</sup>, aktif çamur arıtma tesisinden ve

atık stabilizasyon havuzundan 95 numune alınmıştır. Çamur örneklerinin %13.6'sında, atık stabilizasyon havuzundan alınan örneklerin %5'inde *C. difficile* tespit edilmiştir. Chisholm ve ark.<sup>(81)</sup> tarafından Avustralya'da yapılan bir çalışmada ham atık suyun %90.5'inde (114/126), arıtılmış atık suyun %48.1'inde (50/104), ıslah edilen sulama suyunun %40'ında (2/5) *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen izolatların yarısından fazlasının (%55.3) toksinojenik olduğu, hipervirulent RT078 suşu da dahil olmak üzere, A+ B+ CDT+ toksin gen profiline sahip izolatlar olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada elde edilen izolatların tamamının rifaksimisin, fidaksomisin, metronidazol ve amoksisilin-klavulanik aside karşı duyarlı olduğu ancak izolatlarda eritromisin, tetrasiklin ve klindamisine karşı direnç gözlemlendiği belirtilmiştir. Atık su arıtma tesisi ve göl tortusunda *C. difficile* varlığı araştırılan çalışmada<sup>(82)</sup>, atık sudan iki toksinojenik olmayan izolat ve tortu örneğinden bir toksinojenik izolat elde edilmiştir. Tüm izolatların insan kaynaklı izolatlar ile yakın genomik ilişki gösterdiği belirtilmiştir.

2007 yılında Finlandiya'daki içme suyu dağıtım sistemi, toplumda büyük bir gastroenterit salgına neden olan arıtılmış atık su ile kontamine olmuştur. Yapılan araştırmada<sup>(83)</sup>, musluk suyundan beş ve arıtılmış kanalizasyon atığından yedi olmak üzere 12 toksin pozitif *C. difficile* izolatı elde edilmiş ve musluk suyu dağıtım sisteminde *C. difficile* kontaminasyonu ve toksinojenik *C. difficile*'nin sular aracılığı ile bulaşmasının mümkün olduğu ifade edilmiştir.

Lin ve ark.<sup>(24)</sup> 2003-2007 yılları arasında Massachusetts'de gerçekleşen 129 sel olayı ve 1575 *C. difficile* enfeksiyonu tanısı arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. 19-64 yaş arası hastaların *C. difficile* enfeksiyonu için acil servis ve ayakta izleme ziyaretlerinin sel olayından sonraki 7-13 gün boyunca arttığını gözlemlemişlerdir. Sel olayından sonraki 27 güne kadar CDI için sel dışında, başka risk faktörü gözlemlemediklerini ve selden sonraki 7-13 günlük dönemin CDI açısından riskli olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca iklim değişikliği ile birlikte gelecekte daha fazla sel olayının ön görülmesiyle CDI'nda artış olabileceğini ifade etmişlerdir.

Al-Saif ve Brazier<sup>(84)</sup> tarafından Galler'de yapılan bir çalışmada nehir sularında %87.5, deniz suyunda %44, göl suyunda %46.7, yüzme havuzu sularında %50 ve musluk sularında %5.5 *C. difficile* tespit edilmiştir. Nehirler ve deniz suyundaki *C. difficile* kirliliğinin kaynağı olarak yüksek nüfus yoğunlukları, tarımsal drenaj, sel suları ve kanalizasyon atık çıkışlarından kaynaklanan kirlenme sorumlu tutulmaktadır<sup>(85)</sup>. Deniz, göl, nehir gibi sucul ekosistemlere atık su ve sel suları ile *C. difficile* karışma ihtimali, bu ortamlarda bulunan su ürünlerinin, *C. difficile* ile kontamine olma olasılığını güçlendirmektedir.

### Su ürünlerinde *Clostridioides difficile* varlığı

Su ürünleri kaynaklı patojenlerin çoğu, sucul ortamlarda, su ürünlerinin yüzeylerinde ve işleme sırasında su ürünleri ile temas eden yüzeylerde, üç boyutlu yapılar olan biyofilmler oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar gıdalarda biyofilm oluşturduğunda uzun süre hayatta kalabilmekte ve antimikrobialerin çoğuna direnç gösterebilmektedirler<sup>(86)</sup>. *C. difficile*'ye bağlı enfeksiyonların tekrarlanmasında biyofilmler önemli bir faktör olabilir. *C. difficile* DNA, polisakkaritler ve proteinlerden oluşan biyofilm matrisi oluşturur. Toksinler biyofilm matrisi içinde yer alarak enfeksiyona sebep olabilirler. Ayrıca sporların da bu matris içinde yer aldığı bildirilmiştir<sup>(88)</sup>.

Su ürünleri *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum* rezervuarı olarak Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından da vurgulanmaktadır<sup>(89)</sup>. *C. perfringens* ve *C. botulinum* gibi diğer *Clostridium* türleri, benzer bulaşma yollarıyla *C. difficile*'nin su ürünlerine kontaminasyon riski taşıdığını gösteren iyi bilinen gıda kaynaklı patojenlerdir<sup>(90)</sup>. Ayrıca yapılan bir meta analizde kabuklu deniz ürünleri ve domuz eti tüketiminin tüm *C. difficile* ribotiplerine maruz kalma riskini artırdığı ifade edilmiştir.

*Clostridioides difficile* su ürünlerine, kirlenmiş su kaynakları, uygun olmayan gübre uygulamaları, yetersiz pişirme, hijyen programlarının yetersizliği gibi bulaşma faktörleri ile bulaşabilmektedir. Su

ürünlerinde *C. difficile* varlığına dair çalışmalar Tablo 1'de verilmiştir. Taze su ürünlerinin yanında, dondurulmuş, ısıtılmış işlem görmüş, tütülenmiş, kurutulmuş ve konserve su ürünlerinde *C. difficile* varlığı araştırılmıştır.

*Clostridioides difficile*'nin patojen suşlarının insanlara bulaşmasındaki temel kaygı, genellikle çiğ ya da az pişmiş gıdalar olarak tüketilen kabuklu deniz hayvanlarının tüketilmesi ile ilgilidir<sup>(92)</sup>. Ancak *C. difficile* suşları pişirme sıcaklıklarına dayanabilir ve yenilebilir çift kabuklu yumuşakçalar çoğunlukla az pişmiş veya çiğ olarak tüketilmektedirler<sup>(93)</sup>. Pişmiş karideslerdeki *C. difficile* varlığı<sup>(94)</sup> bu endişeyi destekler niteliktedir. Balık ve kabuklu deniz ürünleri için önerilen iç pişirme sıcaklığı 145°F (62.8°C) olarak belirtilmiştir<sup>(95)</sup>. Ancak Rodriguez-Palacios ve LeJeune<sup>(96)</sup> 63°C ısı uygulamasının *C. difficile* sporlarının çimlenmesini teşvik ederek, *C. difficile*'nin geri kazanımını artırdığını bildirmişlerdir. Rodriguez ve ark.<sup>(97)</sup> füme ve kurutulmuş balıklarda *C. difficile* tespit ettiklerini ve bu bulgunun çiğ balığın daha önceden kontamine olduğunu ve/veya kontaminasyonun işleme sırasında gerçekleştiğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca uygulanan ısıtmanın sporları uzaklaştırmak için yeterli olmadığını bildirmişlerdir.

Gıdaların muhafazasında yeterli pişirme sıcaklığının yanında düşük sıcaklıklarda muhafaza da bir koruma yöntemi olarak uygulanmaktadır. Deng ve ark.<sup>(61)</sup> et ve fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisinde *C. difficile* sporlarına -80°C, -20°C, 4°C ve 23°C sıcaklıklarında saklama ve -20°C'den 23°C'ye 10 kez yapılan çözme-dondurma işlemlerinin etkilerini dört ay boyunca incelemişlerdir. Araştırmacılar uygulanan işlemlerin tamamında spor canlılığında azalma gözlemlenmişler ancak sporların önemli ölçüde canlılığını koruyabildiğini ifade etmişlerdir. Marcos ve ark.<sup>(98)</sup> buzdolabı sıcaklıklarında saklanan (4°C) ve dondurularak (-20°C) depolanmış tavuk göğsü, dana biftek, ıspanak yaprakları ve süzme peynirde *C. difficile* (ribotip 078 ve 126) spor canlılığını ve depolama sonrası bu gıdaların hafif pişirme (60°C, 1 saat) uygulanmasını ısıtılmış işlem olmayan kontrol grubu ile karşılaştırarak incelemişlerdir.

Tablo 1. Su ürünlerinde *Clostridioides difficile* varlığı

Su ürünü	Ülke	<i>Clostridioides difficile</i> tespit edilen örnek sayısı /Toplam örnek sayısı	Ribotip	Toksintip	Kaynak
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	İtalya	16/33	014/020, 018, 078, 126, SLO 038, SLO 084, SLO124, 045, 012, SLO 002, 010, 070, SLO 121, SLO 123	0, V	Pasquale ve ark. <sup>(105)</sup>
<i>Tapes philippinarum</i>		10/19	002, SLO 122, 001, 003, 012, 014/020, 078, 106, SLO 063	0, V	
<i>Venus verrucosum</i>		0/1	-	-	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	İtalya	33/912	001, 018, 106, 126, 078, 009, 010, 031, 051, 085, 100, 017, 120, 073	-	Troiano ve ark. <sup>(92)</sup>
<i>Tapes philippinarum</i>		3/13	010, 204, 100	-	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	İtalya	45/387	014, 078, 002,020, 106,651, 012, 449, 010, 009, 031/1, PR17487, 001, 005, 015, 017, 018, 046, 087, 126	-	Agnoletti ve ark. <sup>(94)</sup>
<i>Ruditapes philippinarum/ Chamelea gallina</i>		73/315		-	
Tütsülenmiş, kurutulmuş tatlı su balığı	Kamboçya	4/25	UCL 36	-	Rodriguez ve ark. <sup>(97)</sup>
<i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı)		7/40	-	-	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Gökkuşluğu alabalığı)	İran	3/40	-	-	Nayebpour ve Rahimi <sup>(107)</sup>
<i>Scomberomorus commerson</i>		0/32	-	-	
Barakuda balığı		0/32	-	-	
<i>Scomberomorus guttatus</i>		1/40	-	-	
<i>Crassostrea virginica</i>	ABD	9/19	-	-	Montazeri ve ark. <sup>(108)</sup>
Dondurulmuş deniz tarağı	-		078	V	
Taze levrek	Kanada		078	V	
Dondurulmuş karides	Vietnam	5/119	OVC0	-	Metcalf ve ark. <sup>(93)</sup>
Taze somon	Kanada		078	V	
Pişmiş karides	Kanada		078	V	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		2/3	066, 010	V	
<i>Tapes philippinarum</i>	İtalya	1/1	010	-	Pasquale ve ark. <sup>(89)</sup>
<i>Callista chione</i>		1/2	005	0	
Balık ezmesi; füme, konserve ve çiğ balık	Slovenya	0/157	-	-	Tkalec ve ark. <sup>(109)</sup>
Çift kabuklu yumuşakçalar, karidesler		1/17	010	-	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	İspanya	11/123	-	-	Candel-Pérez ve ark. <sup>(99)</sup>
<i>Crassostrea cornucopiae</i>		0/6	-	-	

Araştırmacılar soğukta saklama işlemlerinin ve hafif pişirme işleminin *C. difficile* sporlarında herhangi bir azalmaya neden olmadığını, ancak 80°C uygulanan ısı işleminin PBS ve gıda matrislerinde benzer seviyelerde azalma sağladığını ifade etmişlerdir. Metcalf ve ark.<sup>(93)</sup> dondurulmuş deniz tarağı ve dondurulmuş karideslerde *C. difficile* varlığını bildirmişlerdir. Gıdalara uygulanacak yeterli pişirme sıcaklığı, mikrobiyal kontrolü sağlamakla birlikte, gıdanın özelliklerine ve bileşenlerine göre değişmektedir. Yapılan çalışmalar, deniz ürünleri için önerilen sıcaklıklarda *C. difficile*'nin inhibe olmadığını göstermektedir.

Candel-Perez ve ark.<sup>(99)</sup> İspanya'da hem balıkçılardan hem de marketlerden temin ettikleri 129 yumuşakça örneğinin 11'inde (%8.5) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Pişirilmiş ve modifiye atmosfer paketlenmiş midyelerde ise *C. difficile* saptamamışlardır. Dört *C. difficile* izolatının ise, toksin A ve B'nin üretiminden sorumlu genleri barındırdığını belirlemişlerdir. Elde ettikleri izolatların tamamı ısı işlem görmemiş örneklerden elde edilmiştir. Başka bir çalışmada<sup>94</sup>, Adriyatik denizi'nden toplanan 702 midye örneğinin 118'inde *C. difficile* saptanmıştır. İzolatların %66.4'ünün toksinojenik olduğu ve bazılarının hipervirulent olduğu belirtilmiştir. Ayrıca %40.7'sinin Avrupa'da *C. difficile* enfeksiyonlarında yaygın olarak izole edilen PCR ribotipleri ile örtüştüğünü ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, elde edilen izolatların tamamının metronidazole duyarlı, sadece bir izolatın vankomisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Suda yaşayan organizmalar tarafından üretilen, salınan ve sızdırılan polimerik bileşenler ve hücre dışı polisakaritlerden oluşan müsila virüsler, bakteriler, fitoplankton ve zooplankton olmak üzere çeşitli organizmaları barındırabilir<sup>(100)</sup>. Kalın müsila tabakası yüzeyi kaplayarak su ile atmosfer arasındaki etkileşimi sınırlamakta ve sudaki oksijenin tükenmesine neden olabilmektedir<sup>(101)</sup>. Deniz müsila ları aralarında *Clostridium* türlerinin de olduğu, gıda kaynaklı hastalıkların çoğundan sorumlu olan patojen bakterilerin bulaşmasında araç olabilir<sup>(102)</sup>. Çözünmüş ve partiküler organik maddelerin (POM) birikmesi, müsila oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır<sup>(103)</sup>. Pasquale ve ark.<sup>(89)</sup> 21 adet istiridye, midye ve

zooplankton örneğinin dokuz tanesinde *C. difficile* saptadıklarını ve izolatların çoğunun toksin A/B pozitif olduğunu, bilinen altı farklı PCR ribotipini (003, 005, 009, 010, 056 ve 066) tanımlanmış olup, bir suşun, yeni bir PCR ribotipini temsil edebileceğini ifade etmişlerdir. Yazarlar zooplankton örneklerinde *C. difficile* varlığının, zooplanktonların POM üzerinde beslenmesi ile ilişkilendirilebileceğini, POM'un anaerobik bakterilerin hayatta kalmasına ve aktivitesine destek veren anaerobik mikro nişler sağladığını belirtmişlerdir. Deniz ürünlerinde *C. difficile* varlığını araştıran çalışmalar (Tablo 1), İtalya, Hırvatistan ve diğer Balkan ülkeleri için önemli bir balıkçılık ve deniz ürünleri kaynağı olan Adriyatik Denizi'nde yoğunlaşmıştır. Adriyatik Denizi, turizm açısından önemli bir bölge olduğu gibi, çevresel kirlenme ve müsila oluşumu gibi sorunlara maruz kalması da bu durumun sebepleri arasında gösterilebilir. Adriyatik Denizi'nin besin maddelerinin büyük bir kısmı yüzey akışı, kentsel deşarjlar ve rüzgar yoluyla taşınmaktadır. Kıyı şeritlerinde çeşitli kentsel, morfolojik, hidrolojik ve oşinografik değişkenlerin etkili olduğu, suyun dikey karışımının batı kıyısına göre doğu kıyısında daha belirgin olduğu bildirilmiştir<sup>(104)</sup>.

Tablo 1'den de görüldüğü gibi Pasquale ve ark.<sup>(105)</sup> İtalya'nın güneyindeki çiftliklerden, balıkçılardan ve arıtma tesislerinden elde ettikleri 53 midye örneğinde %49 oranında *C. difficile* saptamışlardır. Elde ettikleri izolatların %58'inin toksinojenik olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca çalışma alanındaki deniz suyu ve sedimanların mikrobiyolojik kalitesinin Sarno Nehri tarafından taşınan kanalizasyonun artırılmamasından ve drenaj hendeklerinden olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir. Troiano ve ark.<sup>(92)</sup> tarafından daha sonraki yıllarda yapılan çalışmada ise daha fazla midye örneği incelemesine rağmen daha düşük oranda *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir. Adriyatik denizine boşalan farklı kirlilik seviyelerindeki üç nehirde yapılan diğer çalışmada<sup>(106)</sup> nehirlerin patojenik bakterileri kıyı denizine taşıdığını doğrulamaktadır. İşlenmiş su ürünlerinde *C. difficile* tespit edilmiş olması hem bakterinin sporlu bir bakteri olarak işleme koşullarına dirençli olmasının ayrıca biyofilm oluşturarak işleme yüzeylerinden bulaşma olabileceğinin göstergesi olmuştur<sup>(93,97)</sup>.



Farklı yıllarda yapılan çalışmalarda farklı oranlarda *C. difficile* izolasyonu yapılmasında, su kaynaklarının kirliliği, farklı bölgelerden örnek alınması, iklim değişikliğine bağlı sıcaklık artışı ve müsilaj varlığı vb. gibi çeşitli faktörler etkili olmuş olabilir.

Su ürünlerinin toplandığı/yetiştirildiği su kaynaklarının düzenli test edilmesi ve *C. difficile* kontaminasyonunun izlenmesi, su ürünleri ile çalışan kişilerin uygun hijyen önlemlerini alması, su ürünlerinin diğer gıdalar ile temasının önlenmesi için ayrı hazırlama ve saklama alanının kullanılması, uygun işleme tekniklerinin kullanılması ve önerilen pişirme sıcaklığının *C. difficile* için gözden geçirilmesi gibi önlemler su ürünlerinden insanlara *C. difficile* bulaşma riskini azaltabilir.

#### Su ürünlerinden *Clostridioides difficile* izolasyonu

Gıdalardan *C. difficile* izolasyonunda altın bir standart olmamakla birlikte su ürünlerinden *C. difficile* izolasyonunda literatürde kullanılan yöntemler Tablo 2'de özetlenmiştir. Su ürünlerinde *C. difficile* izolasyonu diğer gıdalarda da olduğu gibi

ön zenginleştirmeyi ve ardından seçici besiyerinde kolonilerin tanımlanmasını ve doğrulanmasını içermektedir. Sodyum taurokolat içeren Brain Heart Infusion (BHI)<sup>(92,105,108)</sup>, CDEB<sup>(89)</sup> TCCFB<sup>(94)</sup>, CDGM<sup>(93)</sup>, sodyum taurokolat ve lizozim katkılı CCFB<sup>(109)</sup> ön zenginleştirme besiyerleri olarak kullanılmıştır. Rodriguez ve ark.<sup>(97)</sup> ise tütsülenmiş, kurutulmuş tatlı su balıklarında *C. difficile* varlığını CCFT (CC-Fruktoz Taurokolat) besiyerinde hem ön zenginleştirme hem de doğrudan kültür besiyerine ekim yöntemi ile araştırmışlardır. *C. difficile* pozitif örneklerin %75'ini ön zenginleştirme uygulanan örneklerden elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, balıkların kurutulması sırasında uygulanan 80°C'lik sıcaklığın *C. difficile* sporları için ölümcül seviyede olmadığını ancak bakterinin geri kazanılması için gelişme koşullarının bir ön zenginleştirme ortamıyla daha iyi sağlandığını bu yüzden de doğrudan kültür yöntemi ile tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Ön zenginleştirmenin ardından selektif ortam amacıyla %5 at kanı katkılı CDMN<sup>(89,92,94,105)</sup>, siklosterin-sefoksitin katkılı CDSA<sup>(108)</sup>, Blood Agar<sup>(93)</sup> ve at kanı içeren CCFA<sup>(109)</sup> besiyerleri kullanılmıştır. Ön zenginleştirme için inkübasyon süreleri 7-10 gün arasında değişkenlik göstermiştir. Vejetatif hücrelerin

**Tablo 2. Su ürünlerinden *Clostridioides difficile* izolasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması**

Su ürünü	Örnek/Ön zenginleştirme sıvısı miktarı	Ön zenginleştirme Besiyeri/inkübasyon süresi	Isı/Alkol şoku	Selektif besiyeri/inkübasyon süresi	Kaynak
Çift kabuklu yumuşakça	10 g / 40 mL	BHI+sodyum taurokolat (1.0 g/L)+MN/10 gün	(1:1, %96 etil alkol) 50 dk	CDMN+at kanı (%5)/48 saat	Pasquale ve ark. <sup>(105)</sup>
Çift kabuklu yumuşakça	10 g / 40 mL	CDEB+MN/10 gün	(1:1, %96 etil alkol) 50 dk	CDMN+at kanı (%5)/48 saat	Pasquale ve ark. <sup>(89)</sup>
Çift kabuklu yumuşakça	10 g / 40 mL	BHI+sodyum taurokolat (1.0 g/L)+MN/10 gün	(1:1, %96 etil alkol) 50 dk	CDMN+at kanı (%5)/48 saat	Troiano ve ark. <sup>(92)</sup>
Çift kabuklu yumuşakça	10 g / 40 mL	TCCFB/10 gün	(1:1, %96 etil alkol) 60 dk	CDMN+at kanı (%5)+eskülin (1g/L)/48 saat	Agnoletti ve ark. <sup>(94)</sup>
İstiridyeye	50 g / 40 mL	BHI+ sodyum taurokolat (1.0 g/L)+CC/10 gün	(1:1, %96 etil alkol) 50 dk	CDSA+CC/48 saat	Montazeri ve ark. <sup>(108)</sup>
Çift kabuklu yumuşakça ve balık	15 g / 50 mL	CDGM+MN/7 gün	(1:1, %96 etil alkol) 60 dk	Blood Agar/48 saat	Metcalfe ve ark. <sup>(93)</sup>
Çift kabuklu yumuşakça ve karides	10 g / 90 mL	CCFB+ sodyum taurokolat+lizozim/7 gün	Blood agar üzerinde alkol şoku	CCFA+at kanı (%7, v/v)/48 saat ChromID	Tkalec ve ark. <sup>(109)</sup>

TCCFB: Taurokolat sefoksitin siklosterin fruktoz Broth CDEB: *C. difficile* enrichment broth (proteaz pepton, fruktoz, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaCl, sodyum taurokolat) CDGM: *C. difficile* growth medium (proteaz pepton, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaCl, fruktoz, sodyum taurokolat) BHI: Brain Heart Infusion Agar CCFB: siklosterin-sefoksitin-fruktoz agar MN: Moksolaktam-Norfloksasin CC: Siklosterin-sefoksitin.

ortadan kaldırılması amacıyla ısı şoku<sup>(110,111)</sup> ve alkol şoku uygulanmaktadır. Literatürde su ürünlerinde *C. difficile* varlığını araştıran çalışmaların tamamında alkol şoku uygulanmıştır.

*Clostridioides difficile* için selektif ortam oluşturmak amacıyla besiyerlerine ilave olarak hem Moksalaktam-Norfloksasin (MN) hem de Sikloserin-Sefoksitin (CC) kullanımı mevcuttur. Aspinall ve Hutchinson<sup>(112)</sup> moksalaktam-norfloksasin katkısının, sikloserin-sefoksitin katkısına göre *C. difficile* için daha iyi bir selektif ortam oluşturduğunu bildirmiştir. Bunun yanında MN ve CC gibi seçici ajanların *C. difficile*'nin geri kazanımını olumsuz yönde etkilediği ve gıda örneklerinden yalnızca dirençli *C. difficile* izolatlarının geri kazanılmasına olanak sağladığı da ifade edilmiştir<sup>(113)</sup>. Benzer şekilde Tosun ve ark.<sup>(114)</sup> gıdalara inoküle ettikleri *C. difficile*'nin geri kazanılması çalışmalarında MN içeren besiyerinde inoküle ettikleri standart *C. difficile* suşlarının da inhibe olduğunu, CC içeren besiyerinde ise *C. difficile* dışındaki anaerob floranın inhibe olmadığı bildirmişlerdir. Bu durum var olan *C. difficile* izolatlarının yakalanmasını da güçleştirebilmektedir.

Su ürünlerinde *C. difficile* görülme sıklığındaki farklılık izolasyon yöntemlerindeki farklılıklar ile ilişkilendirilebileceği gibi örnekleme stratejilerine, örnekleme yapıldığı mevsime, suyun sıcaklığına, tuzluluğuna ve örneklenen su ürününün çeşidine göre farklılık gösterebilir. Agnoletti ve ark.<sup>(94)</sup> deniz dibinden daha uzakta beslenen midyelere kıyasla kuma gömülü olarak yaşayan istiridyelerin *C. difficile* ile kontamine olma olasılığının 2.4 kat daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir.

## SONUÇ

CDI için yapılan araştırmalar başlangıçta etkili tedavilerin belirlenmesine odaklanmıştır. Ancak daha fazla CDI salgını ortaya çıktıkça hastanelerde sağlık hizmetleriyle ilişkili salgınları kontrol etmek için farklı stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç giderek artmaktadır. *C. difficile*'nin su ürünlerinde ve sulara yayılımını daha iyi anlamak ve kontrol altına almak için yapılacak çalışmalarda *C. difficile* yayılımının izlenmesi için kapsamlı ve sürekli izleme

programları oluşturulmalıdır. İzleme programları, sağlık yetkilileri ve su ürünleri üreticileri arasında iş birliği yapılarak geliştirilebilir. Özellikle tarım ve hayvancılık faaliyetlerinin yoğun olduğu bölgelerde, su kaynaklarının düzenli olarak test edilmesi büyük önem taşımaktadır. *C. difficile*'nin su ürünleri ve sular üzerinden yayılımına katkıda bulunan çevresel ve insan kaynaklı risk faktörleri detaylı bir şekilde analiz edilmelidir. Su ürünleri ve sular yoluyla bulaşma riskini artıran faktörler, örneğin antibiyotik kullanımının yaygınlığı ve atık yönetim uygulamaları, dikkatle incelenmelidir. Özellikle su ürünleri ve sulara bulunan suşların genetik profili ve toksin üretim özellikleri üzerine araştırmalar yoğunlaştırılmalı ve bu çalışmaların sonuçları kamuya açık veri tabanlarında paylaşılmalıdır. Halk sağlığı ve eğitim programları, su ürünleri ve sular yoluyla bulaşma riskleri hakkında farkındalığı artırmalıdır. Ulusal ve yerel medya ve topluluk eğitim seminerleri aracılığıyla bu programlar geniş kitlelere ulaştırılabilir. Gıda güvenliği ve hijyen uygulamaları konusunda eğitimler verilmeli ve bu alanda farkındalık kampanyaları düzenlenmelidir. Mevcut politika ve yönetmelikler, su ürünleri ve sular yoluyla *C. difficile* yayılımını engelleyecek şekilde güncellenmelidir. Bu güncellemeler düzenleyici kurumlar tarafından yapılacak danışma toplantıları ve çalıştaylar ile sağlanabilir. Bu önerilerin değerlendirilmesi, *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyon riskini azaltarak toplumun genel sağlığını koruyacak, aynı zamanda su ürünleri ve su kaynaklarının güvenliğini artıracaktır. Bu adımların hayata geçirilmesi, ilgili tüm paydaşların iş birliği ve kararlılığıyla, *C. difficile* ile mücadelenin etkinliği ve sürdürülebilirliği açısından önemlidir.

**Teşekkür:** Melike Nur Tosun Demir ve Gizem Taylan Yalçın YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Bursu ile desteklenmiştir.

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

**Finansman:** Bu derleme, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBA-2019-3105 numaralı proje kapsamında yapılan araştırmalardan hazırlanmıştır.

**Acknowledgement:** Melike Nur Tosun Demir and Gizem Taylan Yalçın were supported by YÖK 100/2000 PhD scholarship.

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

**Funding:** This work was supported by the Canakkale Onsekiz Mart University Scientific Research Projects Coordination Unit with project number FBA-2019-3105.

## KAYNAKLAR

- Kelliher K, Kirton OC. Infections in critically ill patients. In: Hupp JR, Ferneini EM, editors. Head, neck, and orofacial infections: An interdisciplinary approach. Elsevier; 2016:383-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28945-0.00028-4>
- Hookman P, Barkin JS. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. World J Gastroenterol. 2009;15(13):1554-80. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1554>
- Reigadas E, Vázquez-Cuesta S, Villar-Gómara L, et al. Role of *Clostridioides difficile* in hospital environment and healthcare workers. Anaerobe. 2020;63:102204. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102204>
- Tschudin-Sutter S. *Clostridioides difficile* infection in outpatient settings - the need for studies on clinical impact. Clin Microbiol Infect. 2019;25(5):534-35. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.024>
- Newcomer EP, Fishbein SRS, Zhang K, et al. Genomic surveillance of *Clostridioides difficile* transmission and virulence in a healthcare setting. mBio. 2024;15(3):e0330023. <https://doi.org/10.1128/mbio.03300-23>
- Sheth PM, Douchant K, Uyanwune Y, et al. Evidence of transmission of *Clostridium difficile* in asymptomatic patients following admission screening in a tertiary care hospital. PLoS One. 2019;14(2):e0207138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207138>
- Halstead FD, Ravi A, Thomson N, et al. Whole genome sequencing of toxigenic *Clostridium difficile* in asymptomatic carriers: insights into possible role in transmission. J Hosp Infect. 2019;102(2):125-34. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.10.012>
- Lim SC, Knight DR, Riley TV. *Clostridium difficile* and one health. Clin Microbiol Infect. 2020;26(7):857-63. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>
- World Health Organization (WHO). Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. WHO; 2008.
- Hain-Saunders NMR, Knight DR, Bruce M, Riley TV. *Clostridioides difficile* infection and one health: an equine perspective. Environ Microbiol. 2022;24(3):985-97. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15898>
- Avberšek J, Pirš T, Pate M, Rupnik M, Ocepek M. *Clostridium difficile* in goats and sheep in Slovenia: Characterisation of strains and evidence of age-related shedding. Anaerobe. 2014;28:163-67. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.009>
- Alves F, Castro R, Pinto M, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides difficile* in companion animals: Genetic overlap with human strains and public health concerns. Front Public Health. 2023;10:1070258. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1070258>
- Freier L, Zacharias N, Gemein S, et al. Environmental contamination and persistence of *Clostridioides difficile* in hospital wastewater systems. Appl Environ Microbiol. 2023;89(5):e0001423. <https://doi.org/10.1128/aem.00014-23>
- Cautivo-Reyes K, Knight DR, Bowie D, Moreira-Grez B, Whiteley AS, Riley TV. Biogeographic distribution and molecular epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in Western Australian soils. Appl Environ Microbiol. 2023;89(10):e0037923. <https://doi.org/10.1128/aem.00379-23>
- Dharmasena M, Jiang X. Improving culture media for the isolation of *Clostridium difficile* from compost. Anaerobe. 2018;51:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.002>
- Ansarian Barezi A, Shakerian A, Rahimi E, Esfandiari Z. Examining the extent of contamination, antibiotic resistance, and genetic diversity of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains in meat and feces of some native birds of Iran. Biomed Res Int. 2023;2023:3524091. <https://doi.org/10.1155/2023/3524091>
- Duc HM, Hoa TTK, Ha CTT, et al. Prevalence and antibiotic resistance profile of *Clostridium perfringens* isolated from pork and chicken meat in Vietnam. Pathogens. 2024;13(5):400. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050400>
- Norman KN, Harvey RB, Andrews K, et al. Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2014;31(6):1127-9. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.888785>
- Eckert C, Burghoffer B, Barbut F. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. J Med Microbiol. 2013;62(2013):1435-8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056358-0>

20. Mitchell M, Nguyen SV, Macori G, Bolton D, et al. *Clostridioides difficile* as a potential pathogen of importance to One Health: A review. *Foodborne Pathog Dis.* 2020;19(12):806-16. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0037>
21. Hellberg RS, Chu E. Effects of climate change on the persistence and dispersal of foodborne bacterial pathogens in the outdoor environment: A review. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(4):548-72. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.972335>
22. Ghazani M, FitzGerald G, Hu W, Toloo GS, Xu Z. Temperature variability and gastrointestinal infections: A review of impacts and future perspectives. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(4):766. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040766>
23. Sadeghi A, Leddin D, Malekzadeh R. Mini Review: The impact of climate change on gastrointestinal health. *Middle East J Dig Dis.* 2023;15(2):72-5. <https://doi.org/10.34172/mejdd.2023.325>
24. Lin CJ, Wade TJ, Hilborn ED. Flooding and *Clostridium difficile* infection: A case-crossover analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(6):6948-64. <https://doi.org/10.3390/ijerph120606948>
25. Cersosimo LM, Worley JN, Bry L. Approaching toxigenic Clostridia from a One Health perspective. *Anaerobe.* 2024;87:102839. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2024.102839>
26. Markovska R, Dimitrov G, Gergova R, Boyanova L. *Clostridioides difficile*, a new “Superbug.” *Microorganisms.* 2023;11(4):845. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040845>
27. Dop D, Marcu IR, Padureanu V, et al. *Clostridium difficile* infection in pediatric patients (Review). *Biomed Rep.* 2024;20(2):18. <https://doi.org/10.3892/br.2023.1706>
28. Kuipers EJ, Surawicz CM. *Clostridium difficile* infection. *Lancet.* 2008;371(9623):1486-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60635-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60635-2)
29. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe.* 2016;40:95-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
30. Tan DT. A *Clostridioides difficile* surveillance study of Canadian retail meat samples from 2016-2018: a possible source of human clinical infections? [MSc Thesis]. Canada: University of Manitoba; 2022.
31. Oren A, Rupnik M. *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: Two validly published and correct names. *Anaerobe.* 2018;52:125-6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.005>
32. Knight DR, Riley TV. Genomic delineation of zoonotic origins of *Clostridium difficile*. *Front Public Health.* 2019;7:164. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00164>
33. Chamgordani S, Yadegar A, Ghourchian H. C. *difficile* biomarkers, pathogenicity and detection. *Clinica Chimica Acta.* 2024;558:119674. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119674>
34. Sugeng CK. Determining the growth limiting conditions and prevalence of *Clostridium difficile* in foods [MSc Thesis]. Canada: University of Ottawa; 2012.
35. Doyle ME. *Clostridium Difficile* as a risk associated with animal sources. *Food Research Institue. FRI Food Safety Reviews.* 2013. [[https://fri.wisc.edu/files/Briefs\\_File/FRI\\_Brief\\_Cdifficile\\_Jan2013.pdf](https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/FRI_Brief_Cdifficile_Jan2013.pdf)] (Erişim Tarihi: 10.Eylül.2024)
36. Sinnathamby ES, Mason JW, Flanagan CJ, et al. *Clostridioides difficile* infection: A clinical review of pathogenesis, clinical considerations, and treatment strategies. *Cureus.* 2023;15(12):e51167. <https://doi.org/10.7759/cureus.51167>
37. Napolitano LM, Edmiston CE. *Clostridium difficile* disease: diagnosis, pathogenesis, and treatment update. *Surgery.* 2017;162(2):325-48. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2017.01.018>
38. Wang L, Villafuerte Gálvez JA, Lee C, et al. Understanding host immune responses in *Clostridioides difficile* infection: Implications for pathogenesis and immunotherapy. *Imeta.* 2024;3(3):e200. <https://doi.org/10.1002/imt2.200>
39. Masset Z, Gunaratnam S, Millette M, McFarland LV, Lacroix M. Environmental and Nutritional Parameters Modulating Genetic Expression for Virulence Factors of *Clostridioides difficile*. *Antibiotics (Basel).* 2024;13(4):365. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040365>
40. Stămăteanu LO, Pleşca CE, Miftode IL, et al. “Primum, non nocere”: the epidemiology of toxigenic *Clostridioides difficile* strains in the antibiotic era—insights from a prospective study at a regional infectious diseases hospital in Eastern Europe. *Antibiotics.* 2024;13(5):461. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050461>
41. Cheknis A, Johnson S, Chesnel L, et al. Molecular epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains recovered from clinical trials in the US, Canada and Europe from 2006-2009 to 2012-2015. *Anaerobe.* 2018;53:38-42. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.009>
42. Marujo V, Arvand M. The largely unnoticed spread of *Clostridioides difficile* PCR ribotype 027 in Germany after 2010. *Infect Prev Pract.* 2020;2(4):100102. <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2020.100102>

43. Drobniak J, Pobrotyn P, Belovičová M, Madziarska K, Trocha M, Baran M. Mortality in *Clostridioides difficile* infection among patients hospitalized at the university clinical hospital in Wrocław, Poland – a 3-year observational study. *BMC Infect Dis.* 2024;24(1):625. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09495-7>
44. Asensio Á, Vallejo-Plaza A, Parra LM, et al. Epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in hospitalized patients in Spain: An eight-year review (2012–2019). *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021;202S0213-005X(21)00179-8. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2021.04.006>
45. Markantonis JE, Fallon JT, Madan R, Alam MZ. *Clostridioides difficile* Infection: diagnosis and treatment challenges. *Pathogens.* 2024;13(2):118. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020118>
46. Liu C, Monaghan T, Yadegar A, Louie T, Kao D. Insights into the evolving epidemiology of *Clostridioides difficile* infection and treatment: A global perspective. *Antibiotics.* 2023;12(7):1141. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071141>
47. Huang J, Li T, Zhu Y, et al. Molecular characterization and potential host-switching of swine farm associated *Clostridioides difficile* ST11. *Vet Microbiol.* 2024;294:110129. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110129>
48. Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, et al. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS One.* 2013;8(9):e73026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>
49. Aktories K, Schwan C, Jank T. *Clostridium difficile* toxin biology. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71(1):281-307. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093458>
50. Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe.* 2016;37:13-24. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009>
51. Aktories K, Papatheodorou P, Schwan C. Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT) - A virulence factor disturbing the cytoskeleton. *Anaerobe.* 2018;53:21-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.001>
52. Geric B, Carman RJ, Rupnik M, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis.* 2006;193(8):1143-50. <https://doi.org/10.1086/501368>
53. Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect.* 2015;3:12-7. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.10.003>
54. Denève C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(Suppl 1):S24-8. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70012-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70012-3)
55. Zhu D, Sorg JA, Sun X. *Clostridioides difficile* biology: Sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00029>
56. Marsh JW, Harrison LH. *Clostridium difficile*: A food safety concern? In: Chen CY, Yan X, Jackson CR, editors. *Antimicrobial Resistance and Food Safety. Methods and Techniques.* Elsevier; 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801214-7.00010-7>
57. Marvaud JC, Bouttier S, Saunier J, Kansau I. *Clostridioides difficile* flagella. *Int J Mol Sci.* 2024;25(4):2202. <https://doi.org/10.3390/ijms25042202>
58. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes.* 2014;5(5):579-93. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969632>
59. Deng K, Talukdar PK, Sarker MR, Paredes-Sabja D, Torres JA. Survival of *Clostridium difficile* spores at low water activity. *Food Microbiol.* 2017;65:274-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.013>
60. Edwards AN, Karim ST, Pascual RA, Jowhar LM, Anderson SE, McBride SM. Chemical and stress resistances of *Clostridium difficile* spores and vegetative cells. *Front Microbiol.* 2016;7:1698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01698>
61. Deng K, Plaza-Garrido A, Torres JA, Paredes-Sabja D. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. *Food Microbiol.* 2015;46:218-21. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.022>
62. Arora J, Oudit D, Austin JW, Ramaswamy HS. Evaluation of thermal destruction kinetics of *Clostridium difficile* spores (ATCC 17857) in lean ground beef with first-order/Weibull modeling considerations. *J Food Process Eng.* 2019;42(7):e13273. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13273>
63. Gerding DN, Muto CA, Owens RC. Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46(Suppl 1):S43-9. <https://doi.org/10.1086/521861>

64. Moore P, Kyne L, Martin A, Solomon K. Germination efficiency of clinical *Clostridium difficile* spores and correlation with ribotype, disease severity and therapy failure. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 9):1405-13. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056614-0>
65. Barbut F. How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment. *J Hosp Infect*. 2015;89(4):287-95. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.12.007>
66. Anjuwon-Foster BR, Tamayo R. A genetic switch controls the production of flagella and toxins in *Clostridium difficile*. *PLoS Genet*. 2017;13(3):e1006701. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006701>
67. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(10):609-20. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108>
68. Spigaglia P, Barketi-Klai A, Collignon A, et al. Surface-layer (S-layer) of human and animal *Clostridium difficile* strains and their behaviour in adherence to epithelial cells and intestinal colonization. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 9):1386-93. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056556-0>
69. Marshall A, McGrath JW, Graham R, McMullan G. Food for thought-The link between *Clostridioides difficile* metabolism and pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2023;19(1):e1011034. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011034>
70. Johannesen PA, Mackin KE, Hutton ML, et al. Disruption of the gut microbiome: *Clostridium difficile* infection and the threat of antibiotic resistance. *Genes (Basel)*. 2015;6(4):1347-60. <https://doi.org/10.3390/genes6041347>
71. Wright GD, Sutherland AD. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends Mol Med*. 2007;13(6):260-7. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.004>
72. Roshan N, Riley TV, Hammer KA. Antimicrobial activity of natural products against *Clostridium difficile* in vitro. *J Appl Microbiol*. 2017;123(1):92-103. <https://doi.org/10.1111/jam.13486>
73. Banawas SS. *Clostridium difficile* Infections: A global overview of drug sensitivity and resistance mechanisms. *Biomed Res Int*. 2018;2018:8414257. <https://doi.org/10.1155/2018/8414257>
74. Spigaglia P, Mastrantonio P, Barbanti F. Antibiotic resistances of *Clostridium difficile*. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1050:137-59. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_9)
75. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*. 2010;50(Suppl 1):S16-23. <https://doi.org/10.1086/647939>
76. Verraes C, Van Boxstael S, Van Meervenne E, et al. Antimicrobial resistance in the food chain: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(7):2643-69. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
77. Thitaram SN, Frank JF, Siragusa GR, et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from food animals on farms. *Int J Food Microbiol*. 2016;227:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.017>
78. Marcos P, Doyle A, Whyte P, et al. Characterization of food chain *Clostridioides difficile* isolates in terms of ribotype and antimicrobial resistance. *Microorganisms*. 2023;11(5):1296. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051296>
79. Ghozzi K, Nakbi A, Challouf R, Dhiab R Ben. A review on microbial contamination cases in Tunisian coastal marine areas. *Water Sci Technol*. 2023;87(9):2142-58. <https://doi.org/10.2166/wst.2023.123>
80. Nikaeen M, Aghili Dehnavi H, Hssanzadeh A, Jalali M. Occurrence of *Clostridium difficile* in two types of wastewater treatment plants. *J Formos Med Assoc*. 2015;114(7):663-5. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2014.12.005>
81. Chisholm JM, Putsathit P, Riley TV, Lim SC. Spore-forming *Clostridium (Clostridioides) difficile* in wastewater treatment plants in Western Australia. *Microbiol Spectr*. 2023;11(1):e0358222. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03582-22>
82. Numberger D, Riedel T, McEwen G, et al. Genomic analysis of three *Clostridioides difficile* isolates from urban water sources. *Anaerobe*. 2019;56:22-6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.01.002>
83. Kotila SM, Pitkänen T, Brazier J, et al. *Clostridium difficile* contamination of public tap water distribution system during a waterborne outbreak in Finland. *Scand J Public Health*. 2013;41(5):541-5. <https://doi.org/10.1177/1403494813481648>
84. Al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol*. 1996;45(2):133-7. <https://doi.org/10.1099/00222615-45-2-133>
85. Lim S, Hain-Saunders NMR, Imwattana K, Putsathit P, Collins DA, Riley TV. Genetically related *Clostridium difficile* from water sources and human CDI cases revealed by whole-genome sequencing. *Environ Microbiol*. 2022;24(3):1221-30. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15821>
86. Henson MA, Phalak P. In silico Analysis of *Clostridium difficile* biofilm metabolism and treatment. *IFAC-PapersOnLine*. 2016;49(26):153-8. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.12.118>

87. Crowther GS, Chilton CH, Todhunter SL, et al. Comparison of planktonic and biofilm-associated communities of *Clostridium difficile* and indigenous gut microbiota in a triple-stage chemostat gut model. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(8):2137-47. <https://doi.org/10.1093/jac/dku116>
88. Pantaléon V, Monot M, Eckert C, et al. *Clostridium difficile* forms variable biofilms on abiotic surface. *Anaerobe.* 2018;53:34-37. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.006>
89. Pasquale V, Romano VJ, Rupnik M, et al. Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from shellfish and marine environments. *Folia Microbiol (Praha).* 2011;56(5):431-7. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0068-3>
90. Warriner K, Xu C, Habash M, Sultan S, Weese SJ. Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection? *J Appl Microbiol.* 2017;122(3):542-53. <https://doi.org/10.1111/jam.13338>
91. Bolton D, Marcos P. The environment, farm animals and foods as sources of *Clostridioides difficile* infection in humans. *Foods.* 2023;12(5):1094. <https://doi.org/10.3390/foods12051094>
92. Troiano T, Harmanus C, Sanders IMJG, et al. Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes in edible marine bivalve molluscs in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2015;208:30-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.002>
93. Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe.* 2011;17(2):85-6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.02.008>
94. Agnoletti F, Arcangeli G, Barbanti F, et al. Survey, characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* from marine bivalve shellfish of North Adriatic Sea. *Int J Food Microbiol.* 2019;298:74-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.003>
95. United States Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service. Safe Food Handling and Preparation. 2020. [<https://www.fsis.usda.gov/food-safety/safe-food-handling-and-preparation/food-safety-basics/safe-temperature-chart>]. (Erişim tarihi: 10.Eylül.2024)
96. Rodriguez-Palacios A, Lejeune JT. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(9):3085-91. <https://doi.org/10.1128/AEM.01589-10>
97. Rodriguez C, Mith H, Taminiau B, et al. First isolation of *Clostridioides difficile* from smoked and dried freshwater fish in Cambodia. *Food Control.* 2021;124:107895. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107895>
98. Marcos P, Glennon C, Whyte P, et al. The effect of cold storage and cooking on the viability of *Clostridioides difficile* spores in consumer foods. *Food Microbiol.* 2023;112:104215. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104215>
99. Candel-Pérez C, Zapata-Galián E, López-Nicolás R, Ros-Berrueto G, Martínez-Graciá C. Presence of toxigenic *Clostridioides (Clostridium) difficile* in edible bivalve mollusks in Spain. *Food Sci Technol Int.* 2020;26(5):413-9. <https://doi.org/10.1177/1082013219894092>
100. Uflaz E, Akyüz E, Bolat F, Bolat P, Arslan Ö. Investigation of the effects of mucilage on Maritime Operation. *J Black Sea.* 2021;27(2):140-53.
101. Karadurmuş U, Sari M. Marine mucilage in the Sea of Marmara and its effects on the marine ecosystem: Mass deaths. *Turkish J Zool.* 2022;46(1):93-102. <https://doi.org/10.3906/zoo-2108-14>
102. Öncül M, Aktaş Z. Potential Clinical Hazards of Pathogenic Microorganisms in Mucilage. In: *Mucilage Problem in the Sea of Marmara.* Istanbul University Press; 2023:21-90. <https://doi.org/10.26650/b/ls32.2023.003.02>
103. Giani M, Savelli F, Berto D, Zangrando V, Čosović B, Vojvodić V. Temporal dynamics of dissolved and particulate organic carbon in the northern Adriatic Sea in relation to the mucilage events. *Sci Total Environ.* 2005;353(1-3):126-38. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.062>
104. Penna A, Marini M, Ferrarin C, et al. Fecal bacteria contamination in the Adriatic Sea: Investigating environmental factors and modeling to manage recreational coastal waters. *Environ Pollut.* 2023;338:122700. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122700>
105. Pasquale V, Romano V, Rupnik M, et al. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. *Food Microbiol.* 2012;31(2):309-12. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.001>
106. Basili M, Campanelli A, Frapiccini E, Luna GM, Quero GM. Occurrence and distribution of microbial pollutants in coastal areas of the Adriatic Sea influenced by river discharge. *Environ Pollut.* 2021;285:117672. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117672>

107. Nayeypour F, Rahimi E. Incidence and profiles of antibiotic resistance and putative genes of the *Clostridium difficile* recovered from fish. *Egyptian J Vet Sci (Egypt)*. 2020;51(3):349-56.  
<https://doi.org/10.21608/ejvs.2020.20517.1142>
108. Montazeri N, Liu D, Janes ME. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in Louisiana Oysters (*Crassostrea virginica*) and environmental waters. *Food Nutr Sci*. 2015;6(11):1065-70.  
<https://doi.org/10.4236/fns.2015.611110>
109. Tkalec V, Jamnikar-Ciglenecki U, Rupnik M, Vadnjal S, Zelenik K, Biasizzo M. *Clostridioides difficile* in national food surveillance, Slovenia, 2015 to 2017. *Euro Surveill*. 2020;25(16):1900479.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.1900479>
110. Jöbstl M, Heuberger S, Indra A, Nempf R, Köfer J, Wagner M. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *Int J Food Microbiol*. 2010;138(1-2):172-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.022>
111. Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(5):819-21.  
<https://doi.org/10.3201/eid1505.081071>
112. Aspinall ST, Hutchinson DN. New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *J Clin Pathol*. 1992;45(9):812-4.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.45.9.812>
113. Barbosa J, Campos A, Teixeira P. Methods currently applied to study the prevalence of *difficile* in foods. *Methods currently applied to study the prevalence of*. *AIMS Agricult Fut*. 2020;5(1):102-28.  
<https://doi.org/10.3934/agrfood.2020.1.102>
114. Tosun MN, Taylan Yalcın G, Korkmazer G, Zorba M, Caner C, Demirel Zorba NN. Disinfection of *Clostridioides difficile* on spinach with epigallocatechin-based antimicrobial solutions and sodium hypochlorite. *Int J Food Microbiol*. 2023;402:110301.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110301>



# Tehditlere Karşı Savaş: Bakteriler Kendilerini Nasıl Savunur? Sistemik Derleme

## *Fighting against the Threats: How do Bacteria Defend Themselves? A Systematic Review*

Can Berk Kurt\*, Gönül Aslan\*

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

**Atf/Cite as:** Kurt CB, Aslan G. Tehditlere karşı savaş: Bakteriler kendilerini nasıl savunur? Sistemik derleme. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):18-26.

### Öz

Bakteriler, dünya genelinde milyarlarca yıldır var olan geniş yaşam alanına sahip mikroorganizmalardır. Evrimsel süreçte çevresel tehditlere karşı çok sayıda defans mekanizması geliştiren bakteriler var olma ve yayılma yeteneklerini arttırmıştır. Penisilin keşfinden kısa bir süre sonra bakterilerin penisilinleri yok eden enzimler geliştirebildiği gözlemlenmiştir, bilim dünyasını bakterilerin savunma mekanizmalarını araştırmaya yöneltmiştir. Bakterilerin sahip olduğu savunma mekanizmaları arasında hücre membranı, kapsül, eflüks pompa sistemleri, hedef modifikasyonu, hareket yeteneği, biyofilmler, quorum-sensing sinyalleri, sekresyon sistemleri, bakteriyosinler, baz ve nükleotid eksizyon onarım sistemleri, nötralizasyon ve keşfi ile rekombinant DNA teknolojisinde gelişmelere sebep olan restriksiyon modifikasyon sistemleri yer alır. Biyotik tehditlerden olabildiğince korunmak için geliştirilmiş olan bu mekanizmaları anlamak yalnızca tıbbi mikrobiyoloji pratiğinde karşılaşılabileceğimiz antimikrobiyal savunma mekanizmaların açığa çıkarılması açısından değil, ayrıca bakteri biyolojisi ve anti-faj mekanizmalarının anlaşılması için de önem taşımaktadır. Bu derlemede, bakterilerin savunma mekanizmalarının güncel bilgiler ışığında incelenmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Bakteriyel Savunma Mekanizmaları, Antibiyotik Direnci, Restriksiyon Modifikasyon Sistemi, Biyofilm, CRISPR-Cas, Bakteriyosinler

### ABSTRACT

Bacteria have been existing around the world for billions of years, with a vast living space. Throughout their evolutionary process, bacteria have been developing numerous defense mechanisms against environmental threats, enhancing their ability to survive and proliferate. Bacteria developed the enzymes that could destroy penicillin shortly after its discovery; this prompted the scientific community to investigate the defense mechanisms present in bacteria. Bacteria have various defense mechanisms, including the cell membranes, capsules, efflux pump systems, target modification, motility, biofilms, quorum-sensing signals, secretion systems, bacteriocins, base and nucleotide excision repair systems, neutralization, and restriction-modification systems that led to advancements in recombinant DNA technology. Understanding the foundation of bacterial defense strategies is crucial not only for uncovering antimicrobial defense mechanisms encountered in medical microbiology practice but also for understanding bacterial biology and anti-phage mechanisms. Bacterial defense mechanisms are examined elaborately in this review article.

**Keywords:** Bacterial Defense Mechanisms, Antibiotic Resistance, Restriction Modification System, Biofilm, CRISPR-Cas, Bacteriocins

**Alındığı tarih / Received:**  
15.08.2024 / 15.August.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**  
07.01.2025 / 07.January.2025

**Yayın tarihi / Publication date:**  
24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

C. B. Kurt 0000-0002-7641-2605  
G. Aslan 0000-0002-1221-7907

✉ canberkurt.93@gmail.com

## GİRİŞ

Dünya üzerinde derin okyanus tabanlarından kıta yüzeylerine kadar geniş yaşam alanına sahip, 1030'u aşan sayıları<sup>(1)</sup> ile en yaygın hücreler olan ve evrimsel süreçleri boyunca diğer organizmaların tehdidi altında kalan bakteriler, sofistike defans mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bakterilerin

fizyolojisi ve savunma mekanizmalarının evrimi; bakteriyofajlar<sup>(2)</sup>, ökaryotik ya da prokaryotik olabilen avcılar<sup>(3)</sup> ve diğer yarışmacı bakterilere karşı geliştirdiği çeşitli stratejiler yardımı<sup>(4)</sup> ile milyarlarca yılda şekillenmiştir. Penisilin keşfinden kısa bir süre sonra, Abraham ve Chain tarafından 1940'ta penisilin büyüme önleyici özelliğini parçalayan bir enzimin varlığı bilim dünyasına duyurulmuştur<sup>(5)</sup>.

Antibiyotik direnci ve enfeksiyonlarla mücadelede yeni yolların araştırılması, bakterilerin savunma mekanizmalarının açığa çıkarılmasını zorunlu kılmıştır.

### Bakterilerin Karşılaşabileceği Tehditler

Birçok bakteri yoğun, diğer türleri içeren, limitli kaynakların olduğu ortamda yaşar<sup>(6)</sup>. Bu durumun getirdiği kaçınılmaz bir sonuç olarak rakiplerini inhibe eden ya da öldüren, kimyasal, mekanik ya da biyolojik olabilen silahlar ve stratejiler gelişmiştir. Bu silah sistemleri moleküler toksinler, antimikrobiyal peptitler, rakip hücre membranında hasara neden olan nano çıkıntılar olabilmektedir. Tip IV sekresyon sistemi (T4SS) DNA ve protein translokasyonunun yanı sıra yarışmacı bakterilere toksin enjeksiyonunda rolü vardır. Tip VI sekresyon sistemi (T6SS) ile proteinler enjekte edilerek hedef hücre lizise uğratabilir. Tip VII sekresyon sistemleri (T7SS) gram pozitif bakterilerde temas-bağımlı toksin salınımı ile ilişkilidir<sup>(7)</sup>.

Bakteriyofajlar, biyosferdeki en çok bulunan biyolojik varlıklardır<sup>(8)</sup>. 20. yüzyılın başlarında, birbirinden bağımsız olarak iki farklı mikrobiyolog Frederick Twort ve Felix d'Herelle tarafından keşfedilmişlerdir ve bakteri kaynaklı enfeksiyonlara karşı güçlü bir silah olabilecekleri hemen anlaşılmıştır<sup>(9)</sup>. Görece küçük genoma sahip olan bakteriyofaj popülasyonu yüksek derecede genetik çeşitliliğe sahiptir. Genetik materyallerini hücreye enjekte ederek kopyalanmaya ve transkripsiyona anında başlayan litik fajlar konağın zayıf düşmesi ve parçalanması ile litik yaşam döngüsünü sonlandırır<sup>(10)</sup>. Litik fajların yanı sıra konaklarını öldürmeyen ancak hücre kaynaklarını faj için kullanan kronik bir replikasyon döngüsüne sahip filamentöz fajlar<sup>(11)</sup> ya da hem litik hem lizojenik özellikler gösterebilen  $\lambda$ -kolifajlar gibi çeşitli bakteriyofajlar bulunmaktadır<sup>(12)</sup>. Öte yandan bakteriyofajların biyoteknolojik anlamda önemli uygulama alanları bulunmaktadır. Hedef bakteriye yüksek spesifiteye sahip bakteriyofajlar, çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin tedavisinde etkili bir mücadele sunabilir. Ayrıca, litik bakteriyofajların bakteri sitoplazmasının içeriğini açığa çıkarması, hücre içi bileşenlerin biyobelirteç olarak kullanılmasına imkan verir. Yani bakteriyofajlar, tanısal anlamda da

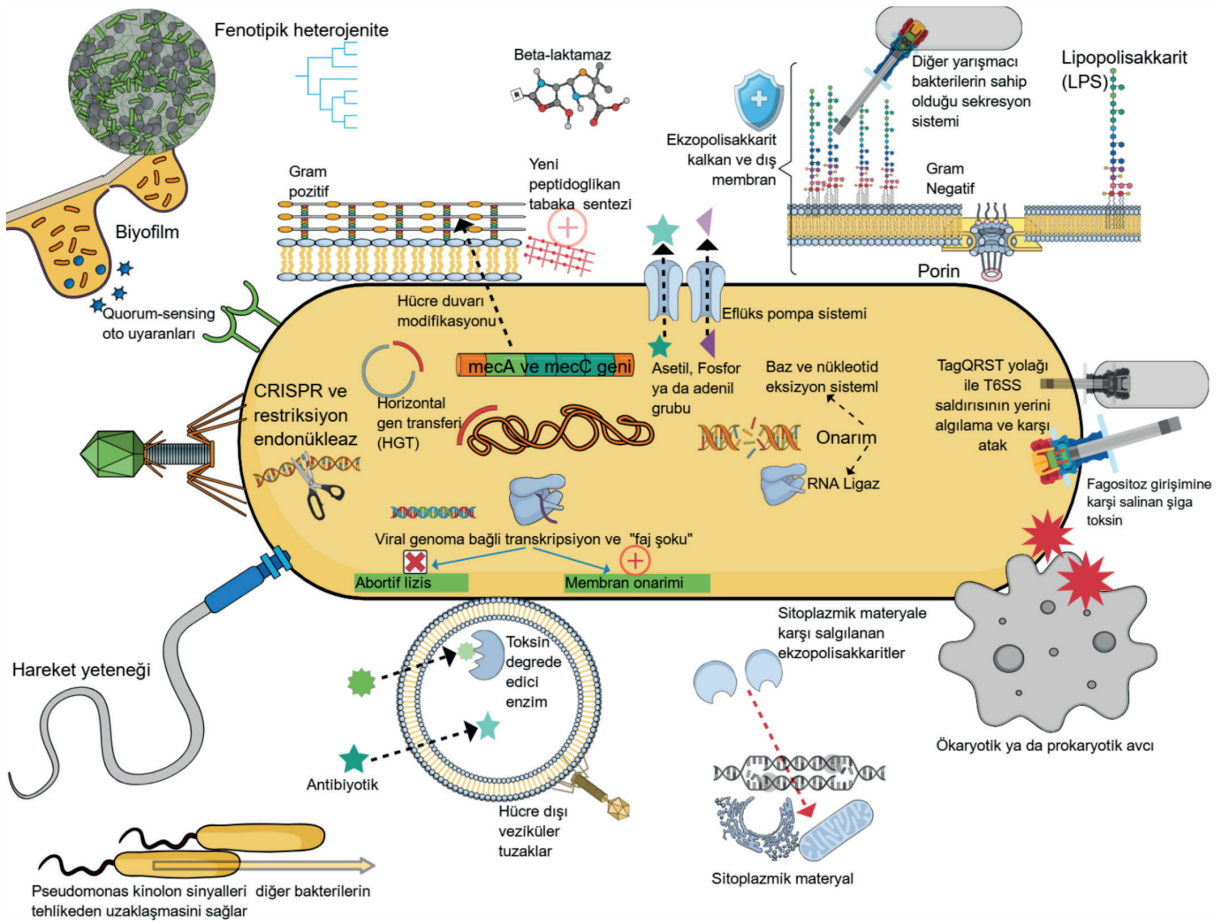
kullanılabilir<sup>(13)</sup>. Bakteriyofajlar gen tedavisi için de önemli bir vektör adayıdır. Ancak, bakteriyofajların retikuloendotel sistem tarafından hızlıca yıkıma uğratılmaları, klinik gen tedavisi uygulamaları için önemli bir engeldir<sup>(14)</sup>.

Viral enfeksiyonlara ek olarak, bakteriler fagositoz ile beslenen serbest yaşayan amipler için avdır<sup>(15)</sup>. *Myxococcus xanthus* gibi bazı bakteriler de hidrolitik enzimleri ile karşılaştıkları bakterileri sindirirler<sup>(16)</sup>. *Bdellovibrio bacteriovorus* gibi avcı bakteriler Gram-negatif bakterilerin içine girebilirler, periplazmaya yerleştikten sonra ise bakterinin sitoplazmik içeriğini hidrolitik sindirime uğratabilirler. Konak hücrenin kaynakları ile bölünerek yeni hücreler oluşturabilir<sup>(17)</sup>. *Bdellovibrio* spp. gibi avcı bakterilerin çoklu ilaç dirençli gram negatif bakteri enfeksiyonlarında potansiyel terapötik ajanlar olabileceğine dair bulgular mevcuttur<sup>(18)</sup>.

### Bakteri Savunma Mekanizmalarına Bakış

Bahsedilen tehditler karşısında, bakteriler moleküler ve hücrel savunma mekanizmalarına sahiptir. Öte yandan bazı savunma sistemleri ise birçok bakterinin bir araya gelerek grup şeklinde davranmasını gerektirir (Şekil 1). Bakteri için hayati öneme sahip moleküller ya da biyokimyasal yollar, saldırıda ana hedeftir. Dolayısıyla bu maddeler ile etkileşime girecek maddeler üretilmektedir. Hedeflerin modifikasyonu, saldırıda kullanılan moleküllerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmakta veya azaltmaktadır. Beta laktam grubu antibiyotikler, hücre duvarı sentezini, penisilin bağlayıcı proteine bağlanarak inaktive eder<sup>(19)</sup>. *Staphylococcus aureus mecA* geni tarafından üretilen düşük afiniteli penisilin bağlayıcı proteinler (PBP2a ya da PBP2') ise hücre duvarını modifiye ederek beta laktam antibiyotiklere duyarsız hale getirir<sup>(20)</sup>. Bu mekanizma, hedef modifikasyonunun en bilinen örneklerinden bir tanesidir.

Bakteri hücreleri, antibiyotikler ve toksinler gibi eksojen ya da ya hücrel metabolizmanın son ürünlerinin sebep olduğu endojen oksidatif DNA hasarını, baz ve nükleotid eksizyon onarım sistemleri ile kompanse edebilirler<sup>(21)</sup>. Bazı durumlarda, tamir etmeye ek olarak, kaybedilen hedefi yerine koymak

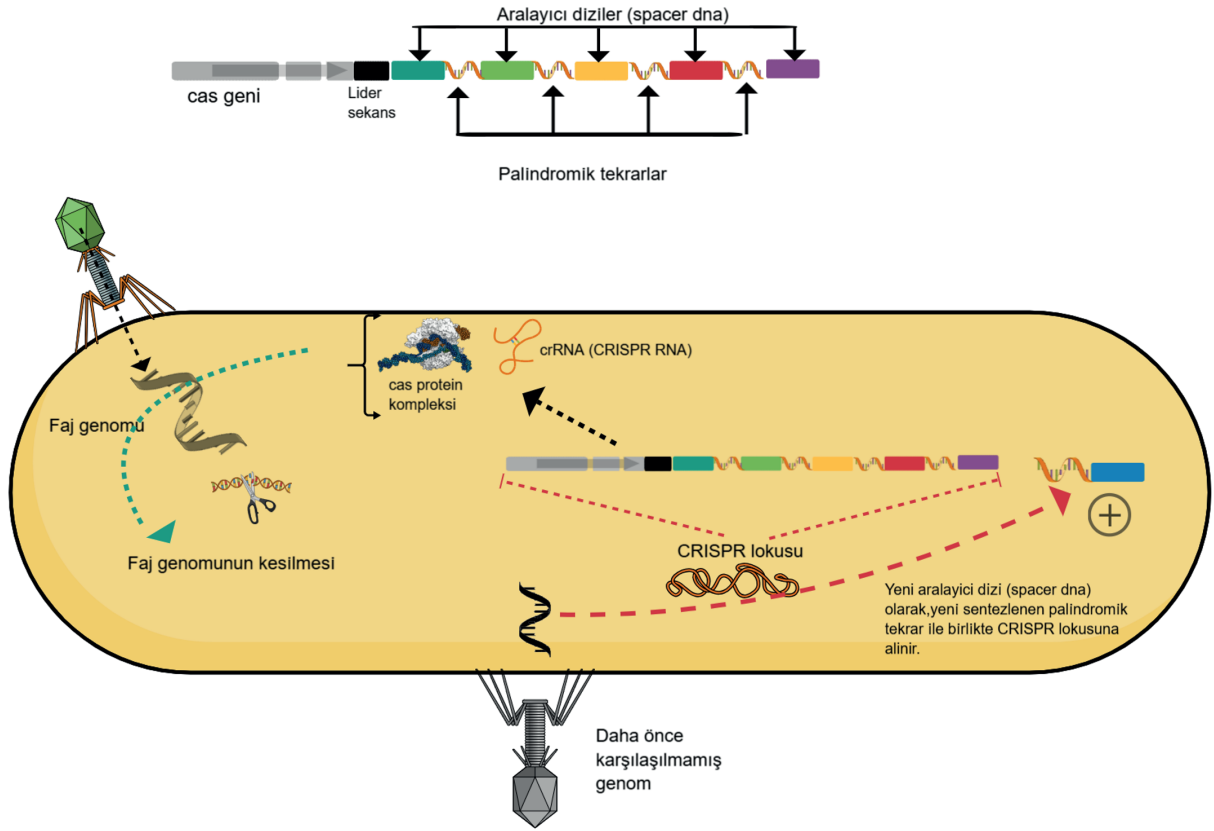


Şekil 1. Bakteriyel savunma mekanizmalarının grafik özeti

ya da miktarını arttırmak gereklidir. Büyük çoğunluğu çapraz bağlı polimer peptidoglikandan oluşan hücre duvarı, bir bakterinin şeklini korumasını sağlayan en önemli elementtir ve bu yapının bütünlüğü hücre canlılığı için temel unsurdur<sup>(22)</sup>. Bakterilerin karşılaşabileceği konak lizozimi, diğer bakterilerin T6SS'i, beta-laktam veya glikopeptit antibiyotikler ve fajlar gibi tehditler, peptidoglikan yapıyı hedef alarak hücre duvarı bütünlüğünü bozabilir ve hücre ölümüne yol açabilir. Hücre duvarında oluşan bozulmaya hem tamir mekanizmaları ile hem de hücre duvarı güçlendirilerek cevap verilir<sup>(23)</sup>.

Zararlı etkenler, henüz etkilerini göstermeden nötralize edilebilirler. Asetiltransferaz, adeniltransferaz, fosfotransferaz gibi enzimatik düzenleme ile asetil, fosfor ya da adenil grubu antibiyotik molekülüne eklenerek birçok antibiyotik etkisiz bırakılabilir<sup>(24)</sup>. Bakteriler aynı zamanda, beta laktam antibiyotiklerin karakteristik beta laktam

halkasını hidrolize ederek etkisiz hale getiren beta laktamazlara sahiptir<sup>(25)</sup>. Restriksiyon modifikasyon sistemleri bakteri savunmasında önemli bir yere sahiptir çünkü bir mikroorganizmanın yabancı genomu kendi genetik materyalinden ayırabilme yeteneği onun hayatta kalması ile doğrudan ilişkilidir. Bakterilerdeki restriksiyon modifikasyon sistemi iki bileşenlidir. Restriksiyon endonükleazlar diğer mikroorganizma DNA'larını sekans spesifik bölgelerden keserler. Metiltransferaz ise bakterinin kendi genomuna metil grubu ekleyerek, yabancı genom kesilirken, bakterinin kendi genomunun yanlışlıkla parçalanmasını önler<sup>(26)</sup>. Bakterilerde yaygın bulunan ve yakın zamanda varlığı ortaya çıkarılan, beş genden oluşan, DISARM (Restriksiyon Modifikasyon ilişkili Savunma Ada Sistemi) bakterilerin metil modifikasyonu olmayan yabancı genoma karşı geliştirdikleri bir savunma mekanizmasıdır<sup>(27)</sup>. Diğer bir savunma mekanizması olan CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short



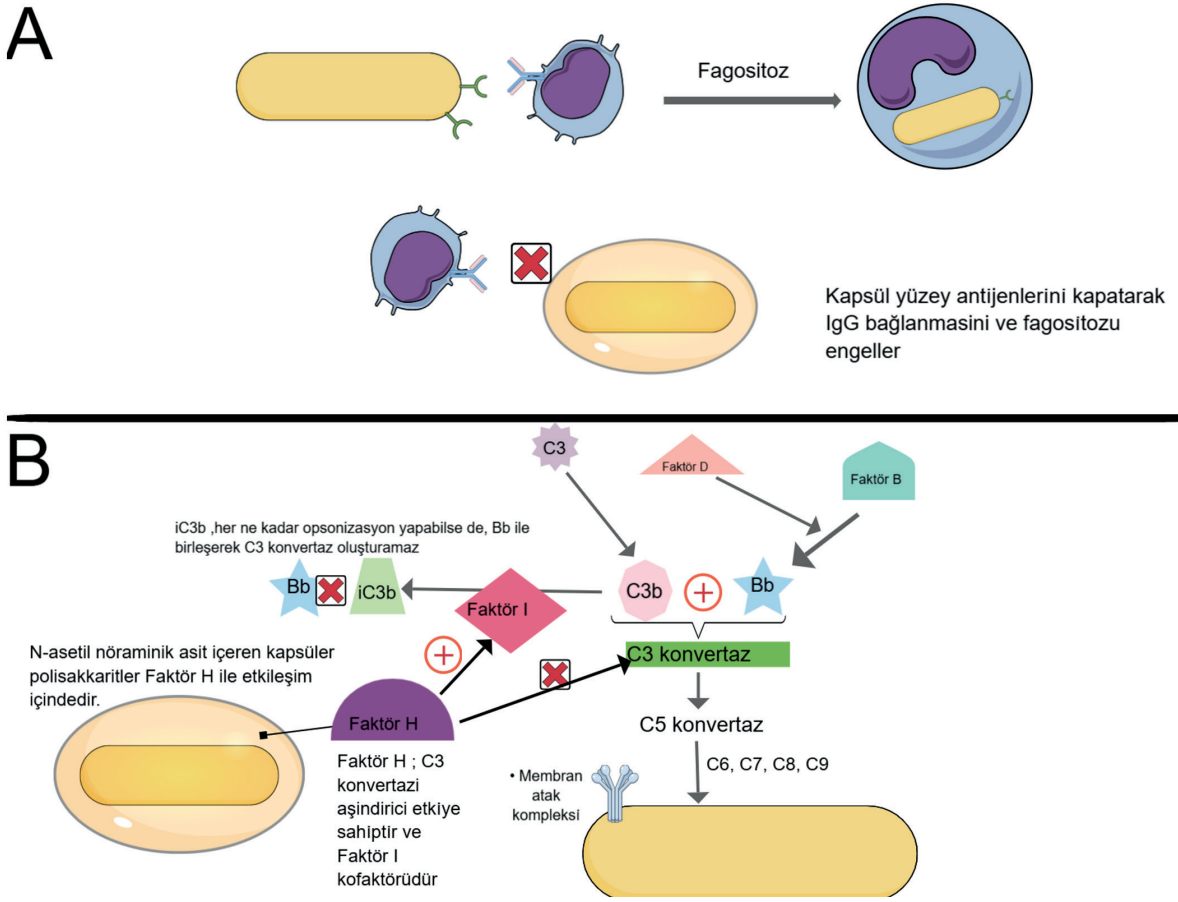
Şekil 2. Bakterilerde CRISPR sistemine bakış

Palindromic Repeats) temel olarak birbirinin aynı olan ancak aralıklı olarak yerleşmiş kısa palindromik tekrarlardan ve bu palindromik tekrarların arasında bulunan farklı DNA sekanslarından (spacer DNA) oluşur. CRISPR lokusu CRISPR-ilişkili *cas* genleri ile çevrilidir. CRISPR, bakterilerin adaptif bağışıklık sistemi olarak, faj genomuna karşı spesifik ve uzun süreli bir bağışıklık sağlayabilir<sup>(28)</sup> (Şekil 2).

Birçok zararlı ajan etkisini göstermeden önce hücre içine girmelidir, bu durumu önlemede bakteri membranları rol alır. Özellikle gram-negatif bakterilerin lipit ve protein çift katlı dış membranı, fosfolipit, protein, lipopolisakarite sahip olup peri plazmayı dış ortamdan ayırır. Porinler ve demir gibi elementler için taşıyıcı moleküllere sahiptir. Bariyer rolünün ötesinde membranlar ekstraselüler veziküller oluşturarak da savunma mekanizmalarına katkıda bulunabilir. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa* içerisinde beta laktamaz bulunan membran veziküllerini enfeksiyon bölgesinde ortama

bırakarak lokal ortamda beta laktam antibiyotiklerinin hidrolizini sağlar<sup>(29)</sup>. Membran oluşturan elemanlar da bariyer fonksiyonu açısından önemlidir. *Vibrio cholerae* tarafından üretilen ekzopolisakaritlere sahip kapsüller ise çeşitli bakteri türlerinin sahip olduğu T6SS'e karşı kalkan görevi görür<sup>(30)</sup>.

Bütün hücreyi çevreleyen kapsül önemli bir savunma mekanizmasıdır. Kapsülü oluşturan monosakaritlerin sayısı, dizilimi, glikozidik bağların yeri ve kimyasal modifikasyonların derecesine bağlı olarak farklı kapsül tipleri vardır. Aynı bakteri türündeki farklı kapsül çeşitleri farklı türde virülansa sahip bakterilerin ortaya çıkmasına sebep olur. Kapsül, bir yüzeye tutunmayı hızlandırarak biyofilm formasyonunda artışa sebep olur. Ayrıca, konak hücrenin patojenlere cevabı olan C3b aracılı nötrofil fagositozu ve kompleman gibi konak savunma mekanizmalarına karşı bakteriye direnç kazandırır<sup>(31)</sup> (Şekil 3).



Şekil 3. Kapsülün IgG aracılı fagositozu engellemesi ve kompleman sistemi üzerine etkisi

Hücreyi çevreleyen yapılar bir ajanın girişine engel olamadığı zaman, bakteri hücreyi giren maddeyi dışarı atmaya çalışır. Eflüks pompaları, hemen bütün bakterilerde bulunan, geniş bir aralıkta substrat spesifitesine sahip olan çeşitli membran transport protein gruplarıdır<sup>(32)</sup>. Birden fazla antibiyotiğin dışarı atılması işlemini gerçekleştirebilirler, çok ilaç dirençli bakterilerin oluşmasına katkıda bulunabilirler<sup>(33)</sup>.

Flagella gibi motilite sistemleri bakteriler için koruyucu etkiye sahiptir. Filament, bazal gövde ve ikisi arasında bağlantıyı sağlayan hareketli kanca kısımlarından oluşan bakteri flagellası sitoplazmik membran boyunca yoğunlukla Na<sup>+</sup> ve H<sup>+</sup> gibi iyonların akışını, rotasyonel bir harekete çevirir<sup>(34)</sup>. Hızla hareket eden bir bakteri protozoa tarafından avlanmaktan korunabilir<sup>(35)</sup>.

Besin dahil birçok kaynak için daimi rekabetin olduğu ve protozoaların avcı tehdidinin oluşturduğu evrimsel baskı, bakterileri replikasyonlarını devam ettirebilecekleri yeni nişler yaratmaya itmiştir. Biyofilmler, bakterilerin protozoaların fagositozundan korunmaları için güvenli alanlardır<sup>(36)</sup>. Ekstraselüler polimerik madde içinde gömülü hücrelerin oluşturduğu biyofilm formasyonunda bakteri sekresyon sistemleri ve quorum-sensing (QS) sinyalleri önemli rol oynar. QS genlerinin aktifleşmesi sekresyon sistemlerinden ortama biyoaktif maddelerin salgılanmasına yol açar. Amonyum, piyomelanin gibi biyofilm içinde bulunan metabolitler avcılar için toksik etkiye sahiptir<sup>(37)</sup>. Birçok kronik enfeksiyonun altında biyofilm yatmaktadır. Biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara duyarlılığı azalttığı, protozoa, insan fagosit hücreleri gibi avcı hücrelerin bakteriyi fagosite

etmesinin önüne geçtiği bilinmektedir. Bir enfeksiyon sürecinin henüz başında, fagositler planktonik tek bir bakteriyi rahatça fagosite edilebilecekken biyofilm ile bunun önüne geçilir<sup>(38)</sup>. Biyofilmleri; içerisindeki bütün bakterilerin birbirinin klonal kopyası olduğu çok hücreli bir dayanışma olarak düşünmek yanlış olur çünkü biyofilm içerisindeki bakteri popülasyonu fizyolojik durumları açısından geniş bir aralık gösterir. Biyofilm içindeki aynı tür bakterilerin biyolojik aktivitelerinin, metabolik yollarının ve stress cevaplarının gen ifadesi birbirlerinden farklıdır. Yani biyofilm her ne kadar klonal bir yapı gibi düşünülse de genotipik ve fenotipik özellikleri birbirinden farklı bakteriler barındırır<sup>(39)</sup>. Bakteri grubundaki genotip ve fenotipteki popülasyonun değişkenliği, koşullar kötüleştikçe her üyenin aynı oranda kötü etkilenmesinin önüne geçer.

T6SS, temas yolu ile toksik özellikte efektör moleküllerin prokaryotik ya da ökaryotik hücrelere enjekte edildiği, birçok gram negatif bakterinin diğer yarışmacı bakterileri öldürmede kullandığı bir mekanizmadır. *V. cholerae* hücreleri T6SS'ni kullanırken hedef gözetmezler, *P. aeruginosa* T6SS'nin oluşturduğu membran dejenerasyonunu TagQRST yolağı ile algılar ve hasarın lokasyonu hakkında bilgi sahibi olduktan sonra kendi sahip olduğu T6SS ile karşı atak başlatabilir<sup>(40)</sup>. Her ikisi de savunma için saldırının güzel bir örneğidir. Shiga toksin (Stx) kodlayan bakteriyofaj genomuna sahip bakterilerin, ökaryotik bir avcı olan *Tetrahymena thermophila*'yı öldürdükleri gözlenmiştir<sup>(41)</sup>.

Bakteriyosinler, birçok bakteri tarafından sentezlenebilen ve antimikrobiyal özellik gösteren peptitlerdir. Bakteriyosin üreten bakteriler, kendi ürettikleri bakteriyosinlere karşı immünite kazanmış durumdadırlar çünkü bakteriyosin immünitesini kodlayan gen, bakteriyosin yapısal geni ile aynı operondadır<sup>(42)</sup>. Böylece bakteriler ürettikleri bakteriyosini, kendileri etkilenmeden, yakındaki bakterilere karşı antimikrobiyal bir silah olarak kullanabilir. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirerek, reaktif oksijen ürünlerinden normal hücreleri korumaya yardımcı olan önemli bir enzimdir. Böylece önemli yapılar oksidatif hasardan korunmuş olur. *Salmonella Typhimurium*, *Francisella*

*tularensis* gibi hücre içi patojen bakterilerde SOD virülansı arttırmakta, serbest oksijen radikal hasarını azaltmaktadır. Ayrıca *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium leprae*'da SOD indüklenebilir nitrik oksit sentezini ve interferon gamma (IFN-  $\gamma$ ) salınımı inhibe etmektedir<sup>(43)</sup>.

### Savunma Mekanizmalarının Evrimi

Biyolojik fonksiyonların evrimi (adaptasyon), doğal seçilimin sebep olduğu çeşitlilik üzerinden kazanılır. Bakterilerde iki önemli süreç doğal seleksiyona bağlı olarak varyasyonlar oluşturur. Kromozomal yeniden düzenleme ile DNA replikasyon hatalarından köken alan sekans varyasyonları oluşurken horizontal gen transferi farklı hücrelerin gen ve alellerini karıştırarak daha ileri varyasyon oluşmasını sağlarlar. Fajlar, avcılar ya da diğer bakterilerle girilen rekabet bakterilerin üremesini ve hayatta kalmasını etkilemeye başladığında horizontal gen transferi ve mutasyonlar ile oluşan varyantlarda doğal seleksiyon süreci işlemeye başlar. Hatta günümüzde mücadele ettiğimiz geniş çaplı antibiyotik direncinin altında da tam olarak bu mekanizma yatar<sup>(44)</sup>.

Daha büyük organizmalar ile karşılaştırıldıklarında, bakterilerin jenerasyon zamanı kısadır ve popülasyonları geniştir. Bu durum, korunabilen fenotiplerin hızla yükselmesine yol açar. Basit bir nokta mutasyonu, toksinlerin hedeflerine bağlanmasını büyük ölçüde azaltabilirken, bakteriyofajlara, antibiyotiklere, bakteriyosinlere dirençli hale gelmesine yol açabilir. Örneğin *M. tuberculosis* tedavisinin en önemli ilaçlarından rifampisin; *rpoB* tarafından kodlanan DNA bağımlı RNA polimerazın beta alt ünitesini hedef alır. *rpoB* genindeki mutasyonlar  $\beta$ -alt üniteye yapısal değişikliğe sebep olarak ilacın bağlanma afinitesini etkiler ve antibiyotik direncine yol açar<sup>(45)</sup>.

Bakteriler kendilerini yok etmeyi zorlaştıran birçok savunma mekanizmasına sahiptir. Savunma mekanizmaları araştırırken ortaya çıkarılan bilgiler (restriksiyon enzimleri, CRISPR gen düzenleme ve DNA/RNA susturma) klinikte ve moleküler biyolojide birçok uygulama alanı bulmuştur<sup>(46,47)</sup>. Ek olarak, savunma mekanizmaların açığa çıkarılması bakteri

biyolojisini anlamak açısından önemlidir çünkü bir türün belli bir çevrede hayatta kalıp kalamayacağı savunma mekanizmalarına ve onların regülasyonuna bağlıdır. Bazı mekanizmalara yalnızca belirli tehditlere karşı iken bazıları geniş çapta saldırılara karşıdır, bir kısmı ise bakterinin virülansını değiştirerek hastalığın gidişatında rol oynar.

**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

- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6578-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Chao L, Levin BR, Stewart FM. A complex community in a simple habitat: An experimental study with bacteria and phage. *Ecology*. 1977;58(2):369-78. <https://doi.org/10.2307/1935611>
- Sherr EB, Sherr BF. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;81(1-4):293-308. <https://doi.org/10.1023/a:1020591307260>
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(1):15-25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4):677-8.
- Cremer J, Melbinger A, Frey E. Growth dynamics and the evolution of cooperation in microbial populations. *Sci Rep*. 2012;2:281. <https://doi.org/10.1038/srep00281>
- Granato ET, Meiller-Legrand TA, Foster KR. The evolution and ecology of bacterial warfare. *Curr Biol*. 2019;29(11):R521-37. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.024>
- Hatfull GF. Dark matter of the biosphere: the amazing world of bacteriophage diversity. *J Virol*. 2015;89(16):8107-10. <https://doi.org/10.1128/JVI.01340-15>
- Keen EC. Phage therapy: concept to cure. *Front Microbiol*. 2012;3:238. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00238>
- Naureen Z, Dautaj A, Anpilogov K, et al. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Biomed*. 2020;91(13-5):e2020024. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-5.10819>
- Clokier MR, Millard AD, Letarov A V, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. 2011;1(1):31-45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J*. 2017;11(7):1511-20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
- Harada LK, Silva EC, Campos WF, et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res*. 2018;212-213:38-58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther*. 2009;17(5):767-77. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.41>
- Enzinger RM, Cooper RC. Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters. *Appl Environ Microbiol*. 1976;31(5):758-63. <https://doi.org/10.1128/aem.31.5.758-763.1976>
- Thierry S, Kaimer C. The predation strategy of *Myxococcus xanthus*. *Front Microbiol*. 2020;11:2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00002>
- Laloux G. Shedding light on the cell biology of the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Front Microbiol*. 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03136>
- Kadouri DE, To K, Shanks RMQ, Doi Y. Predatory bacteria: a potential ally against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *PLoS One*. 2013;8(5):e63397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063397>
- Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(5):673-91. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>
- Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629-41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Wozniak KJ, Simmons LA. Bacterial DNA excision repair pathways. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(8):465-477. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00694-0>

22. Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(4):585-607. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005>
23. Mueller EA, Levin PA. Bacterial cell wall quality control during environmental stress. *mBio.* 2020;11(5):e02456-20 <https://doi.org/10.1128/mBio.02456-20>
24. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011;47(3):137-46. <https://doi.org/10.3390/medicina47030019>
25. Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill TG. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(2):127-37. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00198>
26. Vasu K, Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(1):53-72. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00044-12>
27. Ofir G, Melamed S, Sberro H, et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol.* 2018;3(1):90-8. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0>
28. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell.* 2014;54(2):234-44. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
29. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1999;181(16):4725-33. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999>
30. Toska J, Ho BT, Mekalanos JJ. Exopolysaccharide protects *Vibrio cholerae* from exogenous attacks by the type 6 secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(31):7997-8002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808469115>
31. Gao S, Jin W, Quan Y, et al. Bacterial capsules: Occurrence, mechanism, and function. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2024;10(1):21. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00497-6>
32. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;453(2):254-267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
33. Nishino K, Yamasaki S, Nakashima R, Zwama M, Hayashi-Nishino M. Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Front Microbiol.* 2021;12:737288 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737288>
34. Thormann KM, Beta C, Kühn MJ. Wrapped Up: The motility of polarly flagellated bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2022;76(1):349-67. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041122-101032>
35. Matz C, Jürgens K. High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(2):921-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.921-929.2005>
36. Hilbi H, Weber SS, Ragaz C, Nyfeler Y, Urwyler S. Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ Microbiol.* 2007;9(3):563-75. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01238.x>
37. Hoque MM, Espinoza-Vergara G, McDougald D. Protozoan predation as a driver of diversity and virulence in bacterial biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2023;47(4):fuad040 <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad040>
38. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS.* 2013;121(s136):1-58. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>
39. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(3):199-210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
40. Stolle AS, Meader BT, Toska J, Mekalanos JJ. Endogenous membrane stress induces T6SS activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(1):e2018365118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018365118>
41. Lainhart W, Stofa G, Koudelka GB. Shiga toxin as a bacterial defense against a eukaryotic predator, *Tetrahymena thermophila*. *J Bacteriol.* 2009;191(16):5116-22. <https://doi.org/10.1128/JB.00508-09>
42. Gajic O, Buist G, Kojic M, Topisirovic L, Kuipers OP, Kok J. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34291-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211100200>



43. Maurya R, Namdeo M. Superoxide dismutase: A key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host. In: Ahmad R, Surguchov A, editors. Reactive Oxygen Species. Biochemistry, IntechOpen; 2022. [<https://doi.org/10.5772/intechopen.100322>] (Erişim tarihi: Ağustos.2024)
44. Smith WPJ, Wucher BR, Nadell CD, Foster KR. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(8):519-34. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00877-3>
45. Ma X, Wang H, Deng Y, et al. *rpoB* gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong Province, China. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3409-12. <https://doi.org/10.1128/JCM.00515-06>
46. Roberts RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(17):5905-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500923102>
47. Huang YY, Zhang XY, Zhu P, Ji L. Development of clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated technology for potential clinical applications. *World J Clin Cases.* 2022;10(18):5934-45. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i18.5934>

# İmipenemin *Escherichia coli* Gen İfadesi Profiline Kısa ve Uzun-Dönemli Etkilerinin Belirlenmesi

## *Evaluation of Short- and Long-term Effects of Imipenem on Gene Expression Profile in Escherichia coli*

Hüseyin Özgür Özdemirel\*<sup>ORCID</sup>, Sibel Küçükıldırım\*<sup>ORCID</sup>

\* Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Atf/Cite as:** Özdemirel HÖ, Küçükıldırım S. İmipenemin *Escherichia coli* gen ifadesi profiline kısa ve uzun-dönemli etkilerinin belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):27-34.

### Öz

**Amaç:** Hastalık etkeni bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde yaygın olarak kullanılan pek çok antibiyotikğin etki mekanizmasının halen tam olarak anlaşılammış olmasına ilaveten antibiyotiklere maruz kalmanın bakterilerde kısa ve uzun dönemde neden olduğu etkiler hakkındaki bilgilerimiz de sınırlıdır. Bu çalışmada, imipenem antibiyotikğinin *Escherichia coli*'de yol açtığı etkilerin belirli zaman aralıklarında karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Eş zamanlı olarak oluşturulan *E. coli* kültürlerine öldürücü olmayan dozda imipenem uygulanmıştır. Farklı zaman aralıklarında örneklenen kültürlerde imipenemin neden olduğu hücrel etkiler RNA dizileme yöntemiyle incelenmiştir.

**Bulgular:** Antibiyotik uygulanan kültürlerde, hücre membranında yer alan proteinleri ya da bu proteinlerin taşınmasında rol oynayan diğer proteinleri kodlayan genler (*yajC*, *ldcA*, *lolA*, *ldtC*, *ygdI*) ve atım pompaları (*yhE*) ile ilişkili genlerin ifadelerinde istatistiksel olarak önemli artış olduğu gözlemlenmiştir.

**Sonuç:** Gen ifadesi profilinde zamana bağlı değişimlerin tespit edildiği bu çalışma ile, düşük doz antibiyotik uygulamasının bakterilerde antibiyotik direncinin kazanılmasına kısa ve uzun dönemde sağlayacağı katkılar karşılaştırmalı olarak ortaya koyulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, karbapenem, RNA dizileme

### ABSTRACT

**Objective:** Resistance of disease-causing bacteria to antibiotics is a significant public health problem. Besides the fact that the mechanism of action of many common antibiotics is still not fully understood, our knowledge about the short and long-term effects of exposure to antibiotics on bacteria is also limited. We aimed to evaluate the impact of imipenem on *Escherichia coli* at certain time intervals comparatively, in the present study.

**Methods:** Non-lethal doses of imipenem were simultaneously applied to *E. coli* cultures. The cellular effects caused by imipenem in cultures sampled at different time intervals were examined by RNA sequencing.

**Results:** Statistically significant changes were observed in the expression of genes encoding proteins located in the cell membrane or proteins involved in the transportation of these proteins (*yajC*, *ldcA*, *lolA*, *ldtC*, *ygdI*) and genes that are directly related to efflux pumps (*yhE*).

**Conclusion:** This study compared the short and long-term effects of low doses of antibiotics on the development of antibiotic resistance in bacteria by analyzing gene expression profiles.

**Keywords:** Antibiotic resistance, carbapenem, RNAseq

**Alındığı tarih / Received:**  
16.08.2024 / 16.August.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**  
25.10.2024 / 25.October.2024

**Yayın tarihi / Publication date:**  
24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

H. Ö. Özdemirel 0000-0002-3284-5185  
S. Küçükıldırım 0000-0003-2241-3060

✉ sibelkucukyildirim@gmail.com

## GİRİŞ

*Escherichia coli* idrar yolu enfeksiyonları, septisemi ve menenjit gibi ciddi hastalıklara neden olabilen fırsatçı bir patojendir. Dirençli Gram-negatif enfeksiyon etkenleri arasında *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca*, plazmit-aracılı AmpC β-laktamaz

üreten başlıca türler olmalarına ek olarak, genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (GSBL) genlerini de yaygın olarak bulundurlurlar<sup>(1)</sup>. Bu durum, tedavi seçeneklerini nispeten azaltmaktadır. GSBL üreten *E. coli* suşları ve diğer çoklu ilaç direncine sahip patojenlerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda etkili olan az sayıdaki ajanlardan biri karbapenem antibiyotikleridir.

Karbapenemler,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin bir alt sınıfıdır ve tüm  $\beta$ -laktam antibiyotikler gibi yapılarında bulunan  $\beta$ -laktam halkası ile bakteri hücre duvarı sentezini engellerler. Ancak kimyasal yapıları itibarıyla penisilin ve sefalosporinlerden farklıdır ve bu yapı, karbapenemlerin antibakteriyel spektrumunun genişlemesine olanak sağlar. Karbapenemler aerobik ve anaerobik, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı etki gösteren geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. İmipenem kompleks mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere ticari olarak temin edilebilen ilk karbapenemdir<sup>(2)</sup>.

Karbapenemler bakteri hücre duvarından kolaylıkla difüze olamadıklarından Gram-negatif bakterilerde genel olarak dış membran (OM) proteinleri ya da porin olarak adlandırılan proteinler aracılığıyla hücreye girerler. Atım pompalarının ifadesinin artması,  $\beta$ -laktamaz üretimi, porinlerin ifadesinin azalması ile porinlerin ve/veya penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) mutasyonlar yoluyla işlevinin değişmesi bakterilerin karbapenemlere karşı direnç geliştirmesini sağlayan mekanizmalar olarak tanımlanmıştır<sup>(2,3)</sup>. Ayrıca, bu mekanizmaların kombinasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *K. pneumoniae*'de direnç seviyesini arttırdığı da gösterilmiştir<sup>(4)</sup>. *E. coli*'de ise, plazmit-aracılı AmpC  $\beta$ -laktamaz üretiminin ve porin ifadesindeki azalmanın karbapenem direncinden sorumlu temel mekanizmalar olduğu öne sürülmüştür<sup>(4-6)</sup>.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) tarafından 2023 yılında yayınlanan ve 29 ülkeyi kapsayan Avrupa Antimikrobiyal Direnç İzleme Raporu'nda, 2017-2021 yılları arasında antimikrobiyal direncinin yaygın olarak gözlemlendiği sekiz bakteri türüne ait veriler sunulmuştur. Bu raporda, Türkiye'de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. türlerinde karbapenem (imipenem ve meropenem) direncinin arttığı ve *E. coli*'de gözlenen karbapenem direncinin Avrupa genelinde %0-1.1 aralığında iken Türkiye'de %4.7 oranında olduğu ortaya

konulmuştur<sup>(7)</sup>. Karbapenem dirençli *E. coli* pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara neden olmasına ek olarak insan ve hayvanlar arasında gözlenen bulaşma sıklığı nedeniyle de önemli bir halk sağlığı endişesi yaratmaktadır<sup>(5,8)</sup>. Avrupa'da ve Türkiye'de karbapenem direncinde gözlenen artış bu antibiyotiklerin etki ve direnç mekanizmalarının detaylı olarak çalışılmasına motivasyon sağlamaktadır.

Bu çalışmada, RNAseq yöntemi kullanılarak, öldürücü olmayan dozda kısa ve uzun süreli imipenem uygulamasının *E. coli* hücrelerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler imipenemin etki mekanizması ve direnç evriminin detaylı olarak anlaşılmasına katkı sunma potansiyeline sahiptir. Ek olarak, farklı sürelerde antibiyotik uygulamasının yarattığı hücresel etkilerin de karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan imipenem antibiyotığının stok çözeltisi üreticinin talimatlarına göre hazırlanmıştır (Sigma, Cat no: PHR1796). Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) ve öldürücü olmayan imipenem konsantrasyonunun belirlenmesi için Andrews'den<sup>(9)</sup> modifiye edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır: *E. coli* ATCC25922 suşu Brain-Heart Infusion besiyerine ekilerek çalkalamalı etüvde 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Ardından, bu kültürden 1/100 oranında Mueller-Hinton sıvı besiyerine ekim yapılmış ve çalkalamalı etüvde (37°C) kültür yoğunluğu McFarland 0.5 bulanıklık standardına eşit olana kadar (yaklaşık dört saat) üretilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşan kültür, serum fizyolojik ile 1/10 oranında seyreltilmiştir. Ardından, 96 kuyucuklu plaka kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32  $\mu$ g/ml) imipenem içeren 0.1 ml Mueller-Hinton besiyerine 500.000 CFU/ml olacak şekilde ekim yapılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır<sup>(9)</sup>. 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından EnSight™ Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) kullanılarak OD değerlerinin 600 nm dalga boyunda ölçülmesiyle

MIK ve öldürücü olmayan imipenem konsantrasyonu belirlenmiştir. Yöntem üç farklı günde, kendi içinde üçer tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve 0.5µg/ml imipenem konsantrasyonunun *E. coli* ATCC25922 için öldürücü olmadığı tespit edilmiştir.

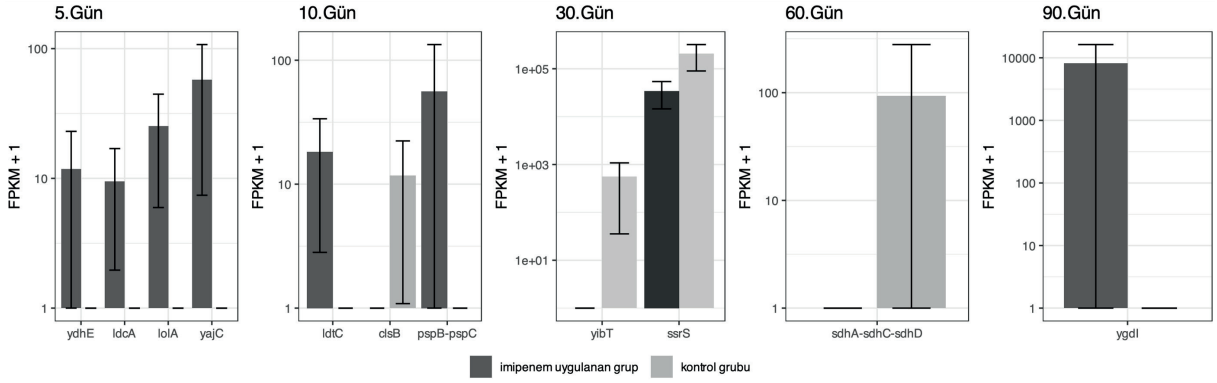
Antibiyotik dozunun tespit edilmesinin ardından, aynı atasal hücreden köken alan toplam 24 soy hattı oluşturulmuştur. Bu soy hatlarından 12 tanesi kontrol grubu olarak antibiyotik içermeyen ortamda 90 gün boyunca üretilmiştir. Deney grubunu oluşturan diğer 12 soy hattı ise, kontrol grubuyla eş zamanlı olarak, öldürücü olmayan dozda (0.5 µg/ml) imipenem içeren ortamda 90 gün boyunca üretilmiştir. Bu süreç boyunca (90 gün), tüm soy hatları, 24 kuyucuklu plakalar kullanılarak her gün taze besiyeri ortamına 1/100 oranında ekilerek üretilmiştir (2 ml besiyerine 20 µl ekim yapılmıştır). Antibiyotiğin kısa (5., 10., 15., 20. gün) ve uzun dönemli (30., 60., ve 90. gün) etkilerinin değerlendirilmesi için tüm soy hatlarından belirtilen günlerde RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu GeneAll marka total RNA izolasyon kiti (Cat no: 305-101) kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak yapılmıştır. İzole edilen RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir. RNAseq kütüphaneleri hazırlanmadan önce RNA miktarları iQuant RNA HS assay kit (ABP Biosciences, Cat no: N016) ve Qubit flourometre kullanılarak ölçülmüştür. Ardından, RNAseq kütüphaneleri NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Cat no: E7770) kullanılarak hazırlanmıştır. Kütüphane hazırlama ve dizileme Ankara Üniversitesi Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezi'nde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Dizileme sonucunda elde edilen ham veriler FastQC kullanılarak kontrol edilmiştir<sup>(10)</sup>. Biyoinformatik analizlerin güvenilir şekilde gerçekleştirilmesi için, öncelikle, ham verilerden kalite skoru düşük okumalar (<30) ve adaptör diziler Trimmomatic kullanılarak çıkarılmıştır<sup>(11)</sup>. Bowtie2 kullanılarak referans genom indekslenmiştir ve okumalar referans genoma (NCBI, GCF\_000743255.1) hizalanmıştır<sup>(12)</sup>.

Samtools ile okumalar haritalanmıştır<sup>(13)</sup>. Cufflinks kullanılarak transkriptomlar bir araya getirilmiş ve genlerin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir<sup>(14)</sup>. Cuffmerge ile örneklerden elde edilen okumalar gruplandırılmış ve karşılaştırmalı analiz yapılabilmesi için birleştirilmiştir<sup>(14)</sup>. DESeq2 R paketi ve Cuffdiff kullanılarak imipenem ve kontrol örnekleri arasında gen ifadesi profillerinin karşılaştırılması yapılmıştır<sup>(14,15)</sup>. Örnekler arasında, gen ifadesi profilleri açısından, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan genler *CummeRbund* R paketi kullanılarak seçilmiş ve gen setleri oluşturulmuştur. *ggplot2* ve *CummeRbund* R paketleri kullanılarak veriler analiz edilmiş ve görselleştirilmiştir<sup>(16,17)</sup>.

## BULGULAR

Imipenemin minimum inhibitör konsantrasyonunun ve öldürücü olmayan dozunun belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır ve uygulanan deneysel şartlarda, 0.5 µg/ml imipenem konsantrasyonunun *E. coli* ATCC25922 için öldürücü olmadığı belirlenmiştir. Ardından, antibiyotiğin kısa ve uzun dönemli etkilerinin değerlendirilmesi için literatürde yer alan deneysel evrim çalışmalarından uyarlanan bir yöntem kullanılmıştır<sup>(18-21)</sup>. Aynı atasal hücreden köken alan 24 soy hattı (12'si kontrol grubu ve 12'si deney grubu olmak üzere) oluşturulmuş ve tüm soy hatları her gün taze sıvı besiyeri ortamına transfer edilerek üretilmiştir. Toplam 90 gün süren bu deneysel evrim çalışması sırasında belirli günlerde (5., 10., 15., 20., 30., 60., ve 90. gün) soy hatlarından izole edilen RNA'lar dizilenmiştir. Dizileme sonucunda, örneklerden ortalama 2980291 ham okuma elde edilmiştir (min= 647196, max= 9585974). Adaptör dizilerin uzaklaştırılması ve kalite skorlarına göre filtrelemeden sonra ortalama 2672531 okuma (min= 566736, max= 8713466) *E. coli* ATCC 25922 referans genomuna hizalanmıştır. Imipenem uygulanan grup ve kontrol grubu arasındaki gen ifadesi farklılıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde  $q < 0.05$  değeri kriter olarak uygulanmıştır.



Şekil 1. Antibiyotik uygulanan grup ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gözlenen genler ( $p < 0.05$ )

Tablo 1. q değerlerine göre örneklerde ifadesi en çok artan on gen

5. gün	10.gün	15. Gün	20. Gün	30.gün	60.gün	90.gün
<i>yhdE</i> *	<i>ldtC</i> *	<i>yohJ-K</i> *	<i>lueO</i> *	<i>yibT</i> **	<i>sdhA-C-D</i> **	<i>ygdI</i> *
<i>ldcA</i> *	<i>clsB</i> **	<i>pstA-C</i> *	<i>damX</i> *	<i>ssrS</i> **	<i>ygeY</i> *	<i>crr</i>
<i>lolA</i> *	<i>pspB-C</i> *	<i>mltA</i> *	<i>rplV</i> *	<i>lepB</i>	<i>FPI65_23345</i> *	<i>yibT</i>
<i>yajC</i> *	<i>BE932_13290</i>	<i>D4N09_07100</i>	<i>ygdI</i> *	<i>fes</i> *	<i>nlpI</i> *	<i>rplB</i>
<i>ppiA</i>	<i>yidQ</i>	<i>ldcA</i>	<i>flhD</i>	<i>lpoA,yraN</i> *	<i>yqeB-C</i> *	<i>rplX</i>
<i>glnP-Q</i>	<i>FPI65_21005</i>	<i>yajG</i>	<i>tsaB</i>	<i>fsa</i> *	<i>recA</i> *	<i>rpsH</i>
<i>accB</i> *	<i>ydeR</i>	<i>yhbY</i>	<i>upp</i>	<i>hisJ</i>	<i>udp</i> *	<i>rplF</i>
<i>sgcQ</i>	<i>mltA</i>	<i>exuT</i> *	<i>ghxQ</i> *	<i>dgcN,yfiR</i>	<i>A5U30_004266</i> *	<i>gltI</i>
<i>thiB-P-Q</i>	<i>ydaV</i>	<i>yjDM</i>	<i>frdC</i> *	<i>uspG</i>	<i>rplX</i> *	<i>cyoB-C-D</i>
<i>traD</i>	<i>tesB</i> *	<i>frdC</i>	<i>yjgA</i>	<i>queD</i>	<i>rpoA</i> *	<i>grcA</i>

\*Kontrol grubunda, imipenem uygulanan grupla karşılaştırıldığında ifadesi düzeyi daha yüksek bulunan genler.

\*\*Kontrol grubu ve imipenem uygulanan grup arasında, ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlenen genler ( $p < 0.05$ ).

Kontrol grubu ve imipenem uygulanan grup gen ifadesi farklılıkları bakımından karşılaştırıldığında, 5. günde izole edilen örneklerde dört genin ifadesinde fark gözlenmişken, 10. günde üç, 30. günde iki, 60 ve 90. günlerde ise sadece tek genin ifadesinde fark bulunmuştur (Şekil 1). 15. ve 20. günlerde ise, grupların gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Imipenem uygulanan grupta, örnekleme yapılan tüm günlerde, q değerlerine göre ifadesi en çok değişen 10 gen Tablo 1'de verilmiştir.

## TARTIŞMA

Murray ve ark.<sup>(22)</sup> tarafından yayınlanan kapsamlı sistematik derlemede, 2019 yılında dünya genelinde yaklaşık her dört ölümden birinin bakteriyel

antimikrobiyal dirençle ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Türkiye antimikrobiyal direncin yüksek olduğu ülkeler arasında yer almaktadır<sup>(7,23)</sup> ve karbapenem dirençli Enterobacterales (CRE) enfeksiyonları yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla dikkat çekmektedir<sup>(24)</sup>. Önceki çalışmalarda, karbapenem direnci genellikle karbapenemaz üretimi ile ilişkilendirilmiştir, ancak porin kodlayan genlerde gerçekleşen mutasyonlar ile bu genlerin ifadesindeki azalma ya da atım pompalarını kodlayan genlerin ifadesinin artmasının da direnç kazanılmasına katkı sağladığı ortaya konulmuştur<sup>(25-28)</sup>. Bakterilerin karbapenemlere karşı direnç kazanmasını sağlayan mekanizmaların çeşitliliği ve dünya genelinde artan CRE kaynaklı enfeksiyonlar dikkate alınarak planlanan bu çalışmada bakterilerin direnç kazanma sürecinde takip ettikleri adımların izlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, karbapenem sınıfından bir antibiyotik

olan imipenemin *E. coli*'de yol açtığı değişikliklerin kısa ve uzun-dönemli etkilerinin gözlenmesi için kültürler farklı günlerde örneklendirilerek RNA dizileme yapılmıştır. Yüksek verimli RNA dizileme yöntemi, kontrol grubu ile antibiyotik uygulanan grubun gen ifadesi profillerinin detaylı incelenmesine ve imipenem direnciyle ilişkisi daha önce tanımlanmamış aday genleri belirlemeye olanak sağlama potansiyeli nedeniyle tercih edilmiştir.

Beşinci günde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, imipenem uygulanan grupta *yajC*, *idcA*, *lola* ve *yhdE* genlerinin ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (Şekil 1). *yajC* geninin ürünü hücre içi protein taşınmasıyla ilişkili bir protein alt birimidir<sup>(29)</sup> ve AcrAB-TolC atım pompası ile tam karakterizasyonu yapılamamış bir etkileşiminin olduğu gösterilmiştir<sup>(30)</sup>. Törnroth-Horsefield ve ark.<sup>(30)</sup> tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *YajC* ve *AcrB* arasındaki etkileşimin kaybıyla doğrudan ilişkilendirilememiş olmasına rağmen, *E. coli*'de *yajC* geninin silinmesinin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere duyarlılığı az miktarda arttırdığı ortaya konulmuştur. *IdcA* geninin kodladığı murein tetrapeptid karboksipeptidaz enzimi hücre duvarı biyogenezi ve peptidoglikan dönüşümünde rol oynamaktadır ve  $\beta$ -laktam antibiyotikler tarafından aktivitesinin engellendiği gösterilmiştir<sup>(31)</sup>. Ek olarak, *E. coli*'de, *IdcA* geninin dahil olduğu bir gen ağının stresle uyarılmış mutagenез ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir<sup>(32)</sup>. Gen ifadesi farkının gözlemlendiği bir diğer gen olan *lola*, iç membrandan dış membrana lipoproteinlerin taşınması ve OM yapısının oluşturulmasında merkezi role sahip olan bir proteini kodlamaktadır<sup>(33)</sup>, *Lola*'nın yokluğunun hücreler için bölünmenin durması ve hücre için toksik olabilecek proteinlerin iç membranda birikmesi gibi ciddi sonuçları olduğu bilinmektedir<sup>(34)</sup>. *Lol* sisteminde görevli proteinler, OM yapısıyla ilişkileri nedeniyle antibiyotiklerin hücreye girişinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar ve yeni antibakteriyellerin geliştirilmesi için umut veren hedefler olarak kabul edilmektedirler<sup>(35)</sup>. *yhdE* geni ise taşıyıcı bir proteini kodlamaktadır ve dahil olduğu protein ailesinin hücre içindeki toksik bileşiklerin ve ilaçların dışa atılmasını sağladıkları bilinmektedir<sup>(36,37)</sup>. Önceki çalışmalarda, bu genin artmış ifadesinin *E. coli*'de çeşitli antibiyotiklere (norfloksasin, doksorubisin, novobiosin, enoksasin ve siprofloksasin), boyalara (rhodamine 6G, ethidium

bromide, acriflavine ve crystal violet) ve amonyumlu bileşiklere (berberine, benzalkonium) karşı direnç sağladığı gösterilmiştir<sup>(37-39)</sup>.

Onuncu günde, imipenem uygulanan grupta *pspB*-*pspC* ve *ldtC* genlerinin ifade düzeyinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. *clsB* geninin ifadesi ise, kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 1). *pspB* ve *pspC* proteinlerini kodlayan genler bakteriyofaj şok operonunda bulunmakta ve transkripsiyonel regülasyonda görev yapmaktadır. Bu operonun besin ya da enerjinin sınırlı olduğu koşullarda hayatta kalmak için rekabette önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir<sup>(40)</sup>. *ldtC* geni, 5. günde ifade artışı gözlenen *ldtA* genine benzer olarak, hücre duvarı biyogenezi ve peptidoglikan biyosentezinde görevli bir enzimi kodlamaktadır<sup>(41)</sup>, bu genin mutant olduğu *E. coli* hücrelerinde zar geçirgenliğinin bozulduğu gösterilmiştir<sup>(42)</sup>. Ayrıca, intraselüler membran yapısının oluşturulmasında temel bir role sahip olan cardiolipin biyosentezinde görevli bir enzimi kodlayan<sup>(43)</sup> *clsB* geninin kontrol grubunda daha fazla ifade edildiği gözlenmiştir.

Otuzuncu günde, *ssrS* ve *yibT* genlerinin ifade düzeyinin kontrol grubunda antibiyotik uygulanan gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). *yibT* geni, henüz karakterizasyonu tamamlanmamış sitoplazmik bir proteini kodlamaktadır. *ssrS* geni ise, *E. coli*'de hücrel streslere yanıt olarak gen ifadesinin düzenlenmesinde görev yapan kodlamayan 6S RNA'yı ifade etmektedir<sup>(44,45)</sup>.

Altmışınca günde, enerji metabolizmasındaki suksinat dehidrogenaz enzimini kodlayan *sdhA*-*sdhC*-*sdhD* genlerinin<sup>(46)</sup> ifade düzeyinin kontrol grubunda antibiyotik uygulanan deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu belirlenmiştir. Doksanıncı günde ise, *ygdI* geninin ifadesinin antibiyotik uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. *ygdI* geni, bir dış membran lipoproteinini kodlamaktadır ve biyofilm formasyonunda rol aldığı düşünülse de henüz hücrel rolü tam karakterize edilememiştir<sup>(47)</sup>.

Sonuç olarak, bu çalışmada antibiyotik etkisinde ifade artışının belirlendiği genlerin neredeyse tamamı hücre membranında yer alan proteinler ile bu proteinlerin taşınmasında rol oynayan diğer proteinleri (yajC, ldcA, lolA, ldtC, ygdI), atım pompalarıyla ilişkili proteinleri (ydhE) veya stres cevabıyla ilişkili proteinleri (pspB-pspC) kodlayan genlerdir. İlk örnekleme gününden (5. gün) itibaren antibiyotik uygulanan grupta çoğunlukla stres cevabı ya da antibiyotik direnciyle ilişkili genlerin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiş olması bu çalışmadan elde edilen en önemli bulgudur. Ayrıca, tüm veriler beraber değerlendirildiğinde, imipenem antibiyotiğinin kısa ve uzun-dönemli uygulanması sırasında ifade düzeyi sürekli artan ya da değişen belirli bir genin belirlenememiş olması da çalışmanın bir diğer ilgi çekici bulgusudur. Imipenem gibi geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı direnç gelişimini inceleyen çalışmaların çoğunda, genellikle ilgili antibiyotiğin etki mekanizmasıyla ve/veya antibiyotik direnciyle ilişkisi iyi tanımlanmış genlere odaklanılmaktadır<sup>(48-50)</sup> ve bu durum, elde edilen sonuçları sınırlandırmaktadır. RNA dizileme yöntemini kullandığımız bu çalışmada öldürücü olmayan dozda uygulanan imipenemin hedef hücrelerde kısa ve uzun dönemli transkriptomik etkileri detaylı olarak incelenmiştir ve elde edilen veriler bu antibiyotiğin hücresel etki mekanizmasının ve direnç evriminin aydınlatılması yönünde literatüre katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FHD-2021-192030). H. Özgür Özdemirel, 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında YÖK tarafından desteklenmiştir. RNA dizileme kütüphanelerinin hazırlanması ve dizilenmesi sırasında sağladıkları teknik destek için Ayşegül Er Gökçe ve Ankara Üniversitesi Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezi üyelerine teşekkür ederiz. Bu araştırma kapsamındaki biyoinformatik analizler TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma kapsamında klinik örnek, insan, hayvan vb. örnekleri ile bu örneklerden elde edilmiş materyaller kullanılmamıştır.

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

**Finansman:** Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FHD-2021-192030). H. Özgür Özdemirel, 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında YÖK tarafından desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** Within the scope of this study, clinical samples, human beings, animals, etc. and materials obtained from these samples were not used.

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

**Funding:** This study was founded by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (FHD-2021-192030). H. Özgür Özdemirel was supported by YÖK within the scope of 100/2000 PhD Scholarship Program.

## KAYNAKLAR

1. Sümer Ş, Kurt Azap O, Aygün G, Akalin H, Akova M, Köksal İ. Dirençli Gram-negatif bakteri infeksiyonlarının yönetiminde sık karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri: Klinik pratiğe yönelik uzman görüşü. *Flora*. 2024;29(1):1-24. <https://doi.org/10.5578/flora.2024011051>
2. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
3. Aurilio C, Sansone P, Barbarisi M, et al. Mechanisms of action of carbapenem resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(3):421. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421>
4. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S521-S8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
5. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3)122. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030122>

6. Huang J, Lv C, Li M, et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* exhibit diverse spatiotemporal epidemiological characteristics across the globe. *Commun Biol.* 2024;7(1):51. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05745-7>
7. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023-2021 data 2023. [<https://www.who.int/europe/publications/item/9789289058537>] (Erişim tarihi: Ağustos.2024)
8. Qamar MU, Aatika, Chughtai MI, et al. Antibiotic-resistant bacteria, antimicrobial resistance genes, and antibiotic residue in food from animal sources: One health food safety concern. *Microorganisms.* 2023;11(1):161. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010161>
9. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(Suppl 1):5-16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
10. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data 2010. [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>] (Erişim tarihi: Ağustos.2024)
11. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
12. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
13. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2009;25(16):2078-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
14. Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* 2012;7(3):562-78. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>
15. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
16. Goff L, Trapnell C, Kelley D. cummeRbund: Amalysis, exploration, manipulation, and visualization of Cufflinks high-throughput sequencing data. R package version 2460. 2024.
17. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. New York: Springer-Verlag; 2016.
18. Long H, Miller SF, Strauss C, et al. Antibiotics treatment enhances the genome-wide mutation of target cells. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2016;113(18):2498-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601208113>
19. Turner CB, Marshall CW, Cooper VS. Parallel genetic adaptation across environments differing in mode of growth or resource availability. *Evol Lett.* 2018;2(4):355-67. <https://doi.org/10.1002/evl3.75>
20. Santos-Lopez A, Marshall C, Scribner M, Synder D, Cooper V. Evolutionary pathways to antibiotic resistance era dependent upon environmental structure and bacterial lifestyle. *Elife.* 2019;8:e47612. <https://doi.org/10.7554/eLife.47612>
21. Kucukyildirim S. Whole-population genomic sequencing reveals the mutational profiles of the antibiotic-treated *Escherichia coli* populations. *Biologia.* 2022;77:525-31. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00959-8>
22. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10325):629-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
23. Isler B, Keske S, Aksoy M, et al. Antibiotic overconsumption and resistance in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(6):651-3. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.024>
24. Akalin H. Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae enfeksiyonlarının tedavisi. Görenek L, editör. Karbapenem Dirençli Gram-Negatif Bakteri Enfeksiyonları kitabında, 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2023:45-60.
25. Öcal D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. *Ankem Derg.* 2012;26(3):154-64. <https://doi.org/10.5222/ankem.2012.154>
26. Miller SI. Antibiotic resistance and regulation of the gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *mBio.* 2016;7:e01541-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01541-16>
27. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3472-500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
28. Lima LM, Silva BNMD, Barbosa G, Barreiro EJ.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem.* 2020;208:112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
29. Komar J, Alvira S, Schulze RJ, et al. Membrane protein insertion and assembly by the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC. *Biochem J.* 2016;473(19):3341-54. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160545>



30. Törnroth-Horsefield S, Gourdon P, Horsefield R, et al. Crystal structure of AcrB in complex with a single transmembrane subunit reveals another twist. *Structure*. 2007;15(12):1663-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.023>
31. Templin MF, Ursinus A, Höltje J-V. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J*. 1999;18(15):4108-17.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4108>
32. Al Mamun AA, Lombardo MJ, Shee C, et al. Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks. *Science*. 2012;338(6112):1344-8.  
<https://doi.org/10.1126/science.1226683>
33. Matsuyama S, Tajima T, Tokuda H. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J*. 1995;14(14):3365-72.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07342.x>
34. Tajima T, Yokota N, Matsuyama S, Tokuda H. Genetic analyses of the in vivo function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett*. 1998;439(1-2):52-4.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01334-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01334-9)
35. Smith HC, May KL, Grabowicz M. Teasing apart the evolution of lipoprotein trafficking in gram-negative bacteria reveals a bifunctional LolA. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2023;120(6):e2218473120.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2218473120>
36. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol*. 1999;31(1):394-5.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01162.x>
37. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2006;59(1):126-41.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04940.x>
38. Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(3):545-56.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg126>
39. Hayashi M, Tabata K, Yagasaki M, Yonetani Y. Effect of multidrug-efflux transporter genes on dipeptide resistance and overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;304(1):12-9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01879.x>
40. Brissette JL, Weiner L, Ripmaster TL, Model P. Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Mol Biol*. 1991;220(1):35-48.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90379-k](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90379-k)
41. Magnet S, Dubost L, Marie A, Arthur M, Gutmann L. Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008;190(13):4782-5.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00025-08>
42. Morè N, Martorana AM, Biboy J, et al. Peptidoglycan remodeling enables *Escherichia coli* to survive severe outer membrane assembly defect. *mBio*. 2019;10(1):e02729-18.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.02729-18>
43. Carranza G, Angius F, Ilioaia O, Solgadi A, Miroux B, Arechaga I. Cardiolipin plays an essential role in the formation of intracellular membranes in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859(6):1124-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.006>
44. Chae H, Han K, Kim KS, Park H, Lee J, Lee Y. Rho-dependent termination of *ssrS* (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of downstream *ygfA* (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase). *J Biol Chem*. 2011;286(1):114-22.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150201>
45. Burenina OY, Elkina DA, Ovcharenko A, et al. Involvement of *E. coli* 6S RNA in oxidative stress response. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3653.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23073653>
46. McCloskey D, Xu S, Sandberg TE, et al. Growth adaptation of *gnd* and *sdhCB* *Escherichia coli* deletion strains diverges from a similar initial perturbation of the transcriptome. *Front Microbiol*. 2018;9:1793.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01793>
47. Abdelwahed EK, Hussein NA, Moustafa A, Moneib NA, Aziz RK. Gene networks and pathways involved in *Escherichia coli* response to multiple stressors. *Microorganisms*. 2022;10(9):1793.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091793>
48. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;254(3):217-25.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00008.x>
49. Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat Commun*. 2014;5:5792.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms6792>
50. Sabino YNV, Santana MF, Oyama LB, et al. Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. *Nat Commun*. 2019;10(1):5252.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13118-0>

# İnsan Papilloma Virüsünü (HPV) Anlamak: HPV'nin Bilinen Bilinmeyenleri

## Understanding Human Papillomavirus (HPV): The Known Unknowns of HPV

Özgenur Hacıoğlu\*<sup>✉</sup>

\* Kırklareli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Kırklareli, Türkiye

Atf/Cite as: Hacıoğlu Ö. İnsan papilloma virüsünü (HPV) anlamak: HPV'nin bilinen bilinmeyenleri. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):35-42.

### Öz

**Amaç:** İnsan papilloma virüsü (HPV-Human papillomavirus) enfeksiyonu dünya genelinde ciddi sağlık sorunlarına yol açmasına rağmen, toplumda yeterli düzeyde tanınmamaktadır. HPV'nin bulaşma yolları, aşılamanın önemi ve tarama programlarının gerekliliği ile ilgili eksik bilgiler, bireylerin korunma ve tedavi seçeneklerinden faydalanmasını engellemektedir. Bu nedenle, HPV ile ilgili eğitim ve bilgilendirme çalışmalarının artırılması, halk sağlığını iyileştirmek için kritik bir adımdır. Bu çalışmada bireylerin HPV hakkındaki bilgi düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bu tanımlayıcı, kesitsel çalışma 18 yaş ve üzeri 212 erkek ve 342 kadın olmak üzere toplam 554 katılımcıyla yürütülmüştür. Kullanılan veri toplama araçları "Katılımcı Tanımlama Formu" ve "HPV Bilgi Ölçeği" olup araştırma "Google Surveys" aracılığıyla çevrimiçi bir platformda gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Katılımcıların %55.4'ünün 28 yaş altı, %44.6'sinin ise 28 yaş ve üstü olduğu görülmektedir. Ayrıca, demografik özelliklerdeki en yüksek oranlar değerlendirildiğinde; katılımcıların %63.2'sinin bekâr ve %35.7'sinin evli olduğu, %63.4'ünün eğitim durumunun üniversite olduğu belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan bilgi testinin tanımlayıcı istatistikleri incelendiğinde; bilgi testinin ortalamasının 9.46±8.53 puan olduğu görülmektedir. Katılımcıların cinsiyetlerine, yaşlarına, medeni durumlarına, eğitim durumlarına ve mesleklerine göre HPV bilgi ölçeği puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Katılımcıların HPV hakkında bilgi karmaşası yaşadığı ve özellikle HPV aşılılarıyla ilgili bilgi düzeylerinin eksik olduğu değerlendirilmiştir.

**Sonuç:** Araştırma bulgularına göre, katılımcıların HPV konusunda kafa karışıklığı yaşadıkları ve HPV aşılı konusunda bilgi eksiklikleri olduğunun değerlendirilmesi, farklı eğitim seviyelerine sahip bireylere yönelik eğitim girişimlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** İnsan papilloma virüsü, HPV enfeksiyonu farkındalığı, HPV aşısı farkındalığı

### ABSTRACT

**Objective:** Despite causing serious healthcare-related problems worldwide, there is a significant lack of information and awareness about the Human Papillomavirus (HPV) infection within the community. Insufficient knowledge regarding its transmission routes, importance of vaccination, and the necessity of screening programs hinders individuals from benefiting of prevention and treatment options. Therefore, increasing educational and informational efforts related to HPV is a critical step towards improving public health. In the present study, it was aimed to determine individuals' level of knowledge regarding HPV.

**Methods:** This descriptive, cross-sectional study was conducted with a total of 554 participants, comprising of 212 men and 342 women aged 18 and older. The data collection tools were the "Participant Identification Form" and the "HPV Knowledge Scale" and the research was carried out on an online platform via "Google Surveys".

**Results:** It was found that 55.4% of the participants were under 28 years of age, while 44.6% were 28 years or older. Additionally, when evaluating the highest proportions of demographic characteristics, it was determined that 63.2% of the participants were single and 35.7% were married, with 63.4% being a university graduate. Upon examining the descriptive statistics of the knowledge test used in the study, the average score was found to be 9.46±8.53. A statistically significant difference was identified in the HPV knowledge scale scores based on the participants' gender, age, marital status, educational background, and occupation ( $p<0.05$ ). It was concluded that participants experienced confusion regarding information about HPV, particularly with deficiencies in their knowledge concerning HPV vaccinations.

**Conclusion:** The research findings that indicate participants' confusion regarding HPV and the gap in their knowledge about HPV vaccinations both highlight the need for educational initiatives tailored to individuals with varying levels of education.

**Keywords:** Human papillomavirus, awareness of HPV infection, awareness of HPV vaccine

**Alındığı tarih / Received:**  
28.09.2024 / 28.September.2024  
**Kabul tarihi / Accepted:**  
28.11.2024 / 28.November.2024  
**Yayın tarihi / Publication date:**  
24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

Ö. Hacıoğlu 0000-0002-8223-4737

✉ ozgenuryilmaz@klu.edu.tr

## GİRİŞ

İnsan papilloma virüsü (HPV-Human papillomavirus), papillomaviridae ailesinde bulunan, 50–55 nm çapında, deri ve mukozal yüzeylerdeki skuamoz epiteli etkileyerek sadece insanda enfeksiyona yol açan, zarfsız bir DNA virüsüdür<sup>(1)</sup>. HPV, dünyadaki cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar içinde yaygın görülen viral enfeksiyon olup, serviks kanseri, genital ve orofaringeal kanserlere, genital siğillere neden olduğu bilinmektedir<sup>(1-3)</sup>.

Günümüzde aşı ile önlenebilen tek kanser serviks kanseridir. İki (genotip-16. 18), dört (genotip-16. 18. 6. 11) ve dokuz (genotip-16. 18. 6. 11. 31. 33. 45. 52. 58) valanlı aşılarda bulunmakta olup, HPV'nin bazı tiplerine karşı korunmada aşılama önemli bir etkidir<sup>(4,5)</sup>.

Yapılan çeşitli çalışmalarda özellikle HPV'nin rahim ağzı kanseri ile ilişkisinin bilinmesinin HPV hakkında farkındalığı zamanla arttırdığı gözlenirse de HPV aşılı konusunda bilgi eksikliğinin devam ettiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra bireylerin HPV konusunda bilgi karmaşası yaşadıkları vurgulanmıştır. Çalışmalar, etnik köken, cinsiyet, eğitim durumu, meslek gibi faktörlerin HPV farkındalığı ve HPV bilgisi ile ilişkili olduklarını bildirmektedir<sup>(6-10)</sup>.

Literatürde HPV'nin neden olduğu hastalıklar, bulaş yolları ve aşı uygulamaları konusunda toplumsal bilincin ve bilginin yeterli seviyede olmadığı belirtilmektedir. Ayrıca araştırmalar HPV enfeksiyonu ve serviks kanseri açısından riskli grupların HPV farkındalığını artırmak için hedeflenmiş müdahalelerin gerekliliğini bildirmektedir<sup>(8)</sup>. Türkiye'de HPV prevalansı bölgelere göre değişmekte olup, popülasyon temelli epidemiyolojik HPV çalışmalarına ihtiyaç duyulduğu değerlendirilmektedir<sup>(11)</sup>. Ayrıca genç ve ileri yaş gruplarında HPV-DNA pozitiflik oranlarının arttığı bildirilmiştir<sup>(12)</sup>.

HPV'ye bağlı enfeksiyonların hem kadın hem de erkek bireyler için artış gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda, bireylerin HPV bulaş, korunma yolları gibi özellikleri hakkında bilgi karmaşası yaratan etmenlerin belirlenmesi, HPV aşılarının popülasyondaki etkinliğinin öngörülebilmesi ve HPV ile ilgili tarama programlarının geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu doğrultuda bu çalışmada bireylerin HPV hakkındaki bilgi düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Kırklareli Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar ve Yayın Etiği Kurulu tarafından (07.11.2023 tarih ve 102922 sayı) onaylanmıştır. HPV Bilgi Ölçeği'nin kullanım izni yazarlardan alınmıştır. Çalışmanın amacı ve yöntemi, çalışmaya başlamadan önce katılımcılara açıklanmıştır. Çalışmaya katılmak için gönüllü olan bireyler çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmanın tüm aşamaları Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak yürütülmüştür.

**Tasarım ve katılımcılar:** Tanımlayıcı, kesitsel türde olan bu çalışma, 18 yaş üstü, internet erişimi ve kullanım bilgisi olan 212 erkek ve 342 kadın olmak üzere toplam 554 katılımcı ile yürütülmüştür. Veriler, 15 Kasım 2023 ile 7 Nisan 2024 tarihleri arasında Google Surveys aracılığıyla kartopu örnekleme kullanılarak çevrimiçi platformda toplanmıştır. Araştırmanın amacını içeren bilgi notu ve bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ilk aşamada katılımcılara iletilmiş ve katılım onayı alınmıştır. Katılımcılardan ad-soyad bilgileri istenmemiştir.

**Ölçüm araçları:** İlk bölümde, katılımcıların sosyodemografik özelliklerini sorgulayan "Katılımcı Tanıma Formu", diğer bölümde ise HPV Bilgi Ölçeği yer almaktadır. Waller ve ark.<sup>(13)</sup> tarafından geliştirilen HPV Bilgi Ölçeğinin Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışması Demir ve ark.<sup>(14)</sup> tarafından yapılmıştır.

HPV, HPV aşısı ve tarama testleri hakkında bilgi düzeyini ölçen ölçek 33 madde ve dört alt bölümden oluşmaktadır. Ölçekten alınabilecek en yüksek puan "33", en düşük puan ise "0" dir. Yüksek bir puan, HPV hakkında yüksek bilgi düzeyini göstermektedir. Çalışma öncesi HPV Bilgi Ölçeğinin kullanım izni yazarlardan alınmıştır.

**İstatistik:** Araştırmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Ver 25.0 istatistik programının Windows için ücretsiz deneme versiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. Verilerin incelenmesinde tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılmıştır. Ölçüm araçlarının Kolmogrov-Smirnov testi ile normal dağılıp dağılmadığı incelenmiştir. Sonuç olarak, değişkenlerin değerlendirilmesinde verilerin normal dağılmadığı belirlenmiş ve parametrik olmayan testler tercih edilmiştir. Analiz sonuçları  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Araştırmaya katılan katılımcıların demografik özellikleri incelendiğinde; araştırmaya 554 kişinin katıldığı, katılımcıların 212'sinin (%38.3) erkek, 342'sinin (%61.7) kadın olduğu belirlenmiştir. Katılımcıların %55.4'ünün 28 yaş altı, %44.6'sının ise 28 yaş ve üstü ve farklı meslek gruplarından olduğu görülmektedir. Ayrıca, demografik özelliklerdeki en yüksek oranlar değerlendirildiğinde; katılımcıların %63.2'sinin bekâr ve %35.7'sinin evli olduğu, %63.4'ünün eğitim durumunun üniversite olduğu görülmektedir. Katılımcılardan %11.9'unun HPV'ye bağlı tanı konulmuş bir hastalığının olduğu belirlenmiştir. HPV'ye bağlı tanı konulan hastalık sorgulandığında; katılımcıların %63.6'sının cinsel bölgede siğil, %1.5'inin ağız bölgesinde siğil, %1.5'inin servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) CIN1, %18.2'sinin servikal intraepitelyal neoplazi CIN2, %12.1'inin servikal intraepitelyal neoplazi CIN3 olduğu ve %3'ünün ise bilgi vermek istemediği görülmektedir. Tüm katılımcılar, HPV hakkında sağlık eğitimi ihtiyacı duyduklarını bildirmiştir (Tablo 1).

Katılımcıların %62.5'inin bugüne kadar, HPV'yi duydukları, %12.6'sının duymadıkları ve %24.9'unun bilmedikleri görülmüştür. Katılımcıların %51.1'inin HPV testini duydukları, 14.6'sının duymadıkları ve %34.3'ünün bilmedikleri belirlenmiştir. Katılımcıların %46'sının HPV aşısını duydukları, %13.2'sinin duymadıkları ve %40.8'inin bilmedikleri değerlendirilmiştir.

Katılımcıların HPV bilgi ölçeği önermelerine verdikleri cevaplar Tablo 2'deki gibidir. Araştırmada kullanılan bilgi testinin tanımlayıcı istatistikleri incelendiğinde; bilgi testinin ortalamasının  $9.46 \pm 8.53$  puan olduğu görülmektedir.

Araştırmaya katılan katılımcıların demografik özelliklerine göre HPV bilgi ölçeği puanlarının karşılaştırılması incelendiğinde; katılımcıların cinsiyetlerine, yaşlarına, medeni durumlarına, eğitim durumlarına, mesleklerine göre HPV bilgi ölçeği puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Kadın katılımcıların HPV bilgi ölçeği puanlarının, erkek katılımcılara göre daha fazla olduğu; yaşı 28 yaş altı olan katılımcıların HPV bilgi ölçeği puanlarının, 28 yaş ve üstü olan katılımcılara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bekâr olan katılımcıların HPV bilgi ölçeği puanlarının, evli olan katılımcılara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Eğitim durumu üniversite ve lisansüstü olan katılımcıların HPV bilgi ölçeği puanlarının, ilkokul / ortaokul ve lise olan katılımcılara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Eğitim durumu lisansüstü olan katılımcıların HPV bilgi ölçeği puanlarının, üniversite olan katılımcılara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Mesleği akademisyen, mühendis, öğretmen, ebelik, fizyoterapi ve rehabilitasyon, öğrenci olan katılımcıların işçi, ev hanımı/çalışmıyor olan katılımcılara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Katılımcıların bugüne kadar HPV'ye bağlı tanı konulmuş bir hastalığa sahip olma durumlarına göre HPV bilgi ölçeği puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ( $p < 0.05$ ). Bugüne kadar HPV'ye bağlı tanı konulmuş bir hastalığı olan katılımcıların HPV bilgi ölçeği puanlarının, olmayan katılımcılara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 1. Katılımcıların demografik özellikleri ve demografik özelliklerine göre HPV bilgi ölçeği puanlarının karşılaştırılması**

Değişkenler		n	%	Med	$\bar{X}$	SS	Test Değeri	p	Bonferroni
Cinsiyet	Erkek	212	38.3	4.00	6.93	7.89	-6.042**	0.000*	
	Kadın	342	61.7	11.00	11.04	8.55			
Yaş	28 yaş altı	307	55.4	11.00	10.42	7.98	-3.569**	0.000*	
	28 yaş ve üstü	247	44.6	5.00	8.28	9.05			
Medeni durum	Bekâr	350	63.2	10.50	10.24	8.16	15.267***	0.000*	1>2
	Evli	198	35.7	3.00	7.92	8.92			
	Diğer (boşanmış, nişanlı, vb.)	6	1.1	14.50	15.33	9.69			
Eğitim durumu	İlkokul / Ortaokul	29	5.2	0.00	2.76	5.64	123.422***	0.000*	3>1, 4>1, 3>2, 4>2, 4>3
	Lise	122	22.0	0.00	3.95	7.21			
	Üniversite	351	63.4	11.00	11.07	7.86			
	Lisansüstü	52	9.4	16.50	15.31	8.60			
Meslek	Akademisyen	30	5.4	18.50	15.73	8.45	122.286***	0.000*	1>6, 2>6, 3>6, 4>6, 5>6, 7>6, 9>6, 1>8, 2>8, 3>8, 4>8, 7>8, 9>8
	Mühendis	33	6.0	12.00	12.30	7.69			
	Öğretmen	23	4.2	11.00	12.13	6.99			
	Ebelik	34	6.1	11.50	11.76	8.19			
	Fizyoterapi ve rehabilitasyon	20	3.6	7.50	8.20	6.88			
	İşçi	86	15.5	0.00	2.43	6.08			
	Öğrenci	205	37.0	11.00	10.68	7.87			
	Ev Hanımı / Çalışmıyor	47	8.5	1.00	5.40	7.98			
Diğer (doktor, mimar, pilot, vb.)	76	13.7	10.00	11.45	8.93				
Bugüne kadar HPV'ye bağlı tanı konulmuş bir hastalık olma durumu	Evet	66	11.9	19.00	16.27	7.76	-6.791**	0.000*	
	Hayır	488	88.1	7.00	8.55	8.22			
HPV ile ilgili olarak geçirilen hastalık	Cinsel bölgede siğil	42	63.6	18.50	15.74	7.94	2.595***	0.762	
	Ağız bölgesinde siğil	1	1.5	16.00	16.00	-			
	Servikal intraepitelyal neoplazi CIN 1	1	1.5	21.00	21.00	-			
	Servikal intraepitelyal neoplazi CIN2	12	18.2	19.50	17.83	7.06			
	Servikal intraepitelyal neoplazi CIN3	8	12.1	17.50	14.75	9.44			
	Paylaşmak istemiyorum	2	3.0	22.00	22.00	4.24			
Bugüne kadar smear testi (Pap-Smear) yaptırma durumu	Evet	103	30.1	9.00	10.78	9.95	-0.589**	0.556	
	Hayır	239	69.9	11.00	11.15	7.90			
HPV hakkında sağlık eğitimi ihtiyacı olduğunu düşünme durumu	Evet	554	100.0	8.00	9.47	8.53	-	-	
	Hayır	0	0.0	-	-	-			

\*p&lt;0.05. \*\*Mann Whitney U testi. \*\*\*Kruskal Wallis testi

**Tablo 2. Katılımcıların HPV bilgi ölçeği önermelerine verdiği yanıtlar**

	Yanlış		Doğru	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
HPV, rahim ağzı kanserine neden olabilir. (Doğru)	242	43.7	312	56.3
Bir kişi, kendisinde HPV olduğunu bilmeden, yıllarca yaşayabilir. (Doğru)	332	59.9	222	40.1
Birden fazla cinsel eşe sahip olmak, HPV bulaşma riskini arttırır. (Doğru)	211	38.1	343	61.9
HPV çok nadir görülür. (Yanlış)	30	5.4	524	94.6
HPV cinsel ilişki sırasında bulaşabilir. (Doğru)	200	36.1	354	63.9
HPV'nin her zaman gözle görülür belirti ve bulguları vardır. (Yanlış)	61	11.0	493	89.0
Prezervatif kullanmak HPV bulaşma riskini azaltır. (Doğru)	270	48.7	284	51.3
HPV, HIV/AIDS'e neden olabilir. (Yanlış)	146	26.4	408	73.6
HPV cinsel bölgedeki ciltten-cilde, temas ile bulaşabilir. (Doğru)	258	46.6	296	53.4
HPV erkeklere bulaşmaz. (Yanlış)	23	4.2	531	95.8
Erken yaşta cinsel ilişkiye girmek, HPV bulaşma riskini arttırır. (Doğru)	367	66.2	187	33.8
HPV'nin birçok tipi vardır. (Doğru)	348	62.8	206	37.2
HPV cinsel bölgede siğillere neden olabilir. (Doğru)	258	46.6	296	53.4
HPV antibiyotiklerle tedavi edilebilir. (Yanlış)	54	9.7	500	90.3
Cinsel açıdan aktif olan kişilerin çoğuna, yaşamlarının bir döneminde HPV bulaşacaktır. (Doğru)	423	76.4	131	23.6
HPV'de genellikle herhangi bir tedaviye gerek yoktur. (Doğru)	517	93.3	37	6.7
Eğer bir kadının HPV testi pozitifse kesinlikle rahim ağzı kanserine yakalanacaktır. (Yanlış)	80	14.4	474	85.6
HPV testi, simir (pap-smear) testi ile aynı anda yapılabilir. (Doğru)	427	77.1	127	22.9
HPV testi size ne kadar zamandan beridir, HPV enfeksiyonunuz olduğunu söyler. (Yanlış)	76	13.7	478	86.3
HPV testi, HPV aşısının gerekli olup olmadığını belirlemek için kullanılır. (Yanlış)	135	24.4	419	75.6
HPV testi yaptırdığınız zaman sonuçlarınızı aynı gün içinde alabilirsiniz. (Yanlış)	57	10.3	497	89.7
HPV testi bir kadında HPV olmadığını gösteriyorsa, o kadının rahim ağzı kanserine yakalanma riski düşüktür. (Doğru)	427	77.1	127	22.9
HPV aşısı olan kızların ileri yaşlarında simir testi yaptırmasına gerek yoktur. (Yanlış)	41	7.4	513	92.6
HPV aşılardan birisi cinsel bölgedeki siğillere karşı koruma sağlar. (Doğru)	394	71.1	160	28.9
HPV aşıları cinsel yolla bulaşan tüm enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. (Yanlış)	78	14.1	476	85.9
HPV aşısı yapılmış olan bir kişi rahim ağzı kanserine yakalanmaz. (Yanlış)	63	11.4	491	88.6
HPV aşıları, rahim ağzı kanser türlerinin birçoğundan korur. (Doğru)	369	66.6	185	33.4
HPV aşısının üç doz yapılması gerekir. (Doğru)	442	79.8	112	20.2
HPV aşılarının en etkili olduğu bireyler hiç cinsel ilişkide bulunmamış olanlardır. (Doğru)	447	80.7	107	19.3
HPV aşısı 11-26 yaşlar arasındaki tüm kadınlara önerilir. (Doğru)	412	74.4	142	25.6
HPV aşısı 30-45 yaşlarındaki kadınlar için lisanslıdır (ruhsatlıdır-izinlidir). (Yanlış)	88	15.9	466	84.1
Mevcut olan her iki HPV aşısı da (Gardasil ve Cervarix) hem cinsel bölge siğillerine hem de rahim ağzı kanserine karşı koruma sağlar. (Yanlış)	148	26.7	406	73.3
HPV aşısının 11-26 yaşlar arasındaki erkeklere yapılmasına izin verilmiştir. (Doğru)	475	85.7	79	14.3

## TARTIŞMA

Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda HPV sıklığının %2.1 ile %25.7 arasında değiştiği bildirilmiştir<sup>(15)</sup>. Araştırmalarda belirli bir popülasyonda HPV’nin prevalansının bilinmesinin. başarılı aşılama ve tedavi stratejileri geliştirilmesi için önemli olduğu değerlendirilmiştir<sup>(11)</sup>. Bunun yanı sıra HPV bulaşının azaltılmasının; bireylerin HPV’ye bağlı hastalıkların bulaşı, tanısı ve tedavisini bilmeleri ile sağlanabileceği düşünülmektedir<sup>(2)</sup>. Sonuç olarak bireylerin HPV farkındalığı ve HPV hakkındaki bilgi düzeylerinin değerlendirilmesi HPV ile mücadelede önemli bir strateji olarak vurgulanmaktadır. Literatürde bireylerin HPV hakkındaki bilgi düzeylerini araştıran çeşitli çalışmalar vardır. Araştırmalarda bireylerin HPV etkeni, bulaş ve korunma yolları hakkındaki bilgi düzeylerinin çeşitli faktörlere göre değişkenlik gösterebileceği vurgulanmaktadır. Bu faktörlere, cinsiyet, eğitim seviyesi, yaş, meslek, HPV’ye bağlı hastalık tanısı almak örnek verilebilir<sup>(5-10,16)</sup>.

Cinsiyet faktörü üzerinden ele alındığında, bazı araştırmalarda kadınların HPV ve HPV aşılı hakkında erkeklere göre bilgi düzeylerinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum, kadınların HPV’nin rahim ağzı kanseri ile bağlantısını kurabilmelerinden dolayı erkeklere göre HPV farkındalığını yükselten bir faktör olmasına bağlanmıştır<sup>(10)</sup>. Bireylerin eğitim seviyesi ile HPV ve HPV aşılı hakkında bilgi düzeylerinin ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda; eğitim seviyesinin artmasıyla farkındalığın da arttığı belirlenmiştir. Eğitim seviyesi üniversite ve üstü olan katılımcıların HPV hakkında daha fazla bilgi sahibi olduğu değerlendirilmiştir<sup>(6)</sup>. Yapılan bu çalışmada da cinsiyet ve eğitim seviyesinin HPV bilgi düzeyleriyle ilişkili olduğu, hem cinsiyeti kadın olan hem de eğitim seviyesi yüksek olan kadın ve erkek katılımcıların HPV ve HPV aşılı hakkında bilgi düzeylerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Literatürde yaş gruplarıyla HPV bilgi düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar vardır. 16-25 yaş arası katılımcının dahil edildiği bir çalışmada; HPV ve HPV aşısı hakkında bilgi oranı %51.8 olarak bulunmuştur<sup>(17)</sup>. Bu çalışmada ise yaş faktörü incelendiğinde; yaşı 28 yaş altı olan

katılımcıların HPV bilgi ölçeği puanlarının, 28 yaş ve üstü olan katılımcılara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Bir diğer faktör olan meslek-HPV hakkındaki bilgi düzeyi ilişkisine bakıldığında; çeşitli çalışmalarda mesleği sağlık alanıyla ilgili olan bireylerin farklı meslek gruplarına mensup bireylerden HPV farkındalığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>(7,16,18)</sup>. Yapılan bir çalışmada ise HPV enfeksiyonlarının önlenmesi ve taranması konusunda hekimler arasında bilgi düzeyinin yüksek; ancak bulaşma, risk faktörleri ve ilişkili hastalıklar konusunda bazı bilgi eksiklikleri olduğu değerlendirilmiştir<sup>(16)</sup>. Bu çalışmada da literatüre paralel olarak, sağlık meslek mensubu olan katılımcıların HPV ve HPV aşılı hakkındaki bilgi düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

Araştırmaya katılan katılımcıların %11.9’unun HPV’ye bağlı tanı konulmuş bir hastalığının olduğu, bu hastalıklar içerisinde; cinsel bölgede siğil, ağız bölgesinde siğil, servikal intraepitelyal neoplazi CIN1, servikal intraepitelyal neoplazi CIN2, servikal intraepitelyal neoplazi CIN3 olduğu görülmektedir. HPV’ye bağlı hastalık tanısı almak faktörünün bilgi düzeyi ile ilişkisi irdelendiğinde ise, hastalık tanısı almış olan katılımcıların tanı almamışlara göre HPV farkındalığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında HPV’ye bağlı hastalık öyküsünün bireylerde HPV farkındalığını arttırdığına yönelik bulgular yer almaktadır. HPV pozitif olan 65 katılımcının yer aldığı bir çalışmada, katılımcıların %58.5’inin HPV’nin neden olduğu hastalıkları bildiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum bireylerin hastalık etkenini yakından tanınması, bulaş, tedavi seçeneklerini araştırması ve bilgilenmesi ile ilişkilendirilmiştir<sup>(19)</sup>.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, HPV bulaş ve korunma yolları hakkında bilgi sahibi olan bireylerin HPV aşılı hakkında bilgi sahibi olan bireylerin HPV aşılı hakkında bilgi sahibi olan bireylerin HPV bulaş ve korunma yolları hakkındaki bilgi düzeyleriyle aşılama oranları arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>(17-19)</sup>. Bu çalışmaya ait bulgular incelendiğinde, katılımcıların HPV aşılı hakkında bilgilerinin eksik olduğu görülmektedir.

Katılımcılardan HPV ve HPV aşıları hakkında kendi bilgi düzeylerini yorumlamaları istenmiş ve %62.5'inin bugüne kadar HPV'yi duyduğu. %51.1'inin HPV testini duyduğu ve %46'sının HPV aşısını duyduğunu bildirmiştir. Mevcut bulgular, rahim ağız kanseri gibi HPV bağlı hastalıklara çeşitli yayın organlarından dikkat çekildiğinden kaynaklanabilir. Katılımcıların vermiş oldukları bu beyanlar, HPV hakkında bilgi sahibi oldukları inancını göstermektedir. Ancak, katılımcıların ölçek önermelerine verdikleri cevaplar incelendiğinde; HPV ile ilgili en temel bilgilerinde yaşadığı karışıklık, eksiklik gibi durumları göstermektedir.

Bunun yanı sıra HPV tarama programları ve aşıları hakkındaki bazı bilgilere verilen yanlış cevaplar, katılımcıların bu konuda bilgilerinin eksik olabileceğini göstermektedir. Katılımcılarda HPV farkındalığı çeşitli yollardan oluşmuş olsa da HPV testleri ve aşıları hakkında bilgi eksikliği olduğu açıktır.

HPV hakkında bilgisi olduğu görüşünde olan bazı katılımcılar, daha önce HPV'ye bağlı hastalık tanısı aldığı ve bu sebeple hastalık etkeni, bulaş yolları, korunma ve tedavi seçeneklerini araştırdıklarını bildirmiştir. HPV ile ilgili olarak tanı alınan hastalık sorgulandığında; %3'ünün bilgi vermek istemediği görülmektedir. Bu durum çoğunlukla bireylerin toplum tarafından kimliğinin açığa çıkabileceği çekincesine bağlanmıştır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda bireylerin HPV hakkında bilgi edinmek için tercih ettikleri kaynakların eğitim, seminer gibi sağlık programları, sağlık çalışanları ve sosyal ağlar olduğu bildirilmiştir<sup>(10,19)</sup>. Yapılan bu çalışmada da tüm katılımcılar, HPV hakkında sağlık eğitimi ihtiyacı duyduklarını bildirmişlerdir. Bu durum bireylerin HPV hakkındaki eksik/yanlış bilgilerinin farkında olduğu ve konuyla ilgili bilgilenmek istediklerini göstermektedir. Özellikle toplumda cinsel yolla bulaşan hastalıklara yönelik eğitim, seminerlere katılımların az olduğu düşünöldüğünde, bireylerin bu tarz konulardaki sağlık eğitimi ihtiyaçlarını bildirmeleri

konuyla ilgili yapılacak eğitim çalışmalarına da zemin oluşturmaktadır. HPV farkındalığının kadınlarda daha yüksek olduğu sonucuna ulaşan araştırmalara paralel olarak bu çalışmada da benzer bulgunun elde edilmesi HPV enfeksiyonu konusunda cinsiyete özgü eğitim planlarının önemini vurgulamaktadır. Bunun yanı sıra eğitim seviyesi ile artan HPV bilgi seviyesi arasındaki belirlenen ilişki farklı eğitim düzeyine sahip bireylere özgü eğitim girişimlerine olan ihtiyacın da göstergesidir.

Çoğu çalışmada olduğu gibi, bu çalışmanın da kısıtlılıkları bulunmaktadır. Çalışma, katılımcıların katılmayı kendilerinin seçtiği kesitsel bir ankettir. Araştırma bulguları katılımcıların kendi beyanlarını içermektedir. Çalışma sonuçları tüm nüfusa genelleştirilemez.

Sonuç olarak; yapılan bu çalışmanın bulguları doğrultusunda bireylerin HPV hakkında bilgi karmaşası yaşadığı ve özellikle HPV aşılarıyla ilgili bilgi düzeylerinin eksik olduğu söylenebilir. HPV'nin neden olduğu hastalıkların, bulaş ve korunma yolları hakkında bireylerin bilgilerini ölçmeyi amaçlayan çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Ayrıca, bireylerin mevcut bilgi düzeylerinin değerlendirilmesi HPV hakkında yapılması planlanan eğitim çalışmalarına katkı sağlayabilir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma Kırklareli Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar ve Yayın Etiği Kurulu tarafından (07.11.2023 tarih ve 102922 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 Kırklareli University, Scientific Research and Publishing Ethical Commission (07.11.2023; 102922).

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

**Funding:** None/not declared.



## KAYNAKLAR

1. Jensen JE, Becker GL, Jackson JB, Rysavy MB. Human papillomavirus and associated cancers: a review. *Viruses*. 2024;16(5):680. <https://doi.org/10.3390/v16050680>
2. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis*. 2014;41(11):660-4. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000193>
3. Preissner SH, Nahles S, Preissner S, Heiland M, Koerdt S. Influence of sex on survival rates of HPV-positive oropharyngeal cancers. *Front Oncol*. 2022;12:917890. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.917890>
4. Ibrahim Khalil A, Zhang L, Muwonge R, Sauvaget C, Basu P. Efficacy and safety of therapeutic HPV vaccines to treat CIN 2/CIN 3 lesions: A systematic review and meta-analysis of phase II/III clinical trials. *BMJ Open*. 2023;13(10):e069616. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-069616>
5. Rosado C, Fernandes ÂR, Rodrigues AG, Lisboa C. Impact of human papillomavirus vaccination on male disease: A systematic review. *Vaccines (Basel)*. 2023;9(11):1083. <https://doi.org/10.3390/vaccines11061083>
6. Husain Y, Alalwan A, Al-Musawi Z, Abdulla G, Hasan K, Jassim G. Knowledge towards human papilloma virus (HPV) infection and attitude towards its vaccine in the Kingdom of Bahrain: cross-sectional study. *BMJ Open*. 2019;9(9):e031017. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031017>
7. Wanderley MD, Sobral DT, Resende CN, et al. Medical students' knowledge of the human papillomavirus (HPV), cervical cancer, and HPV vaccination. *Rev Bras Educ Med*. 2021;45(3):e155. <https://doi.org/10.1590/1981-5271v45.3-20210071.ING>
8. Addisu D, Gebeyehu NA, Belachew YY. Knowledge, attitude, and uptake of human papillomavirus vaccine among adolescent schoolgirls in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *BMC Womens Health*. 2023;23(1):279.
9. Varer Akpinar C, Alanya Tosun S. Knowledge and perceptions regarding Human Papillomavirus (HPV) and willingness to receive HPV vaccination among university students in a north-eastern city in Turkey. *BMC Womens Health*. 2023;23(1):299. <https://doi.org/10.1186/s12905-023-02455-4>
10. Ogbolu MO, Kozłowski M. Assessment of HPV knowledge and awareness among students and staff at IBB University, Niger State, Nigeria: Implications for health education and prevention. *Healthcare (Basel)*. 2024;12(6):665. <https://doi.org/10.3390/healthcare12060665>
11. Dura MC, Aktürk H, Aslan Ö, Yıldız Ş, Kefeli M, Çelik H. Human papillomavirus infection (HPV) prevalence in the black sea region of Turkey: primary hpv screening for cervical cancer. *Cureus*. 2024;16(1):e52615. <https://doi.org/10.7759/cureus.52615>
12. Peker BO, Müderris T, Yurtsever SG, Kaya S. Servikal fırça örneklerinde insan papilloma virüs prevalansı ve genotip dağılımı; Üç yıllık analiz. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg*. 2022;52(3):168-74. <https://doi.org/10.54453/TMCD.2022.72473>
13. Waller J, Ostini R, Marlow LA, McCaffery K, Zimet G. Validation of a measure of knowledge about human papillomavirus (HPV) using item response theory and classical test theory. *Prev Med*. 2013;56(1):35-40. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2012.10.028>
14. Demir Bozkurt F, Özdemir S. Validity and reliability of a Turkish version of the human papillomavirus knowledge scale: a methodological study. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2023;24(3):177-86. <https://doi.org/10.4274/jtgga.galenos.2023.2022-10-9>
15. Williams J, Kostiuk M, Biron VL. Molecular detection methods in HPV-related cancers. *Front Oncol*. 2022;12:864820. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.864820>
16. Mello VM, Santos VC, Baptista AD, et al. Knowledge about human papillomavirus transmission and prevention among physicians in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2023;69(4):e20220291. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20220291>
17. Kops NL, Hohenberger GF, Bessel M, et al. Knowledge about HPV and vaccination among young adult men and women: results of a national survey. *Papillomavirus Res*. 2019;7:123-8. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.03.003>
18. Keten HS, Ucer H, Dalgaci AF, Isik O, Ercan Ö, Guvenc N. Knowledge, attitude, and behavior of teachers regarding HPV (Human Papillomavirus) and vaccination. *J Cancer Educ*. 2021;36(3):584-90. <https://doi.org/10.1007/s13187-019-01668-2>
19. Çetin K. HPV pozitif tanısı konan hastaların Human Papilloma Virüs (HPV) hakkındaki bilgi düzeylerinin değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. Kırklareli: Kırklareli Üniversitesi; 2024.

# SARS-CoV-2 Saptanmasında Real-time PCR: Kullanılan Kit ve Cihaza Göre Değişen Performans

## Real-time PCR detection of SARS-CoV-2: Performances Vary Based on Instrumentation and Kits

Hatice Albayrak<sup>\*@</sup>, Fadile Yıldız Zeyrek<sup>\*\*@</sup>, Akın Yiğın<sup>\*\*\*@</sup>

\* Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

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

\*\*\* Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Genetiği Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

**Atf/Cite as:** Albayrak H, Zeyrek FY, Yiğın A. SARS-CoV-2 saptanmasında real-time PCR: Kullanılan kit ve cihaza göre değişen performans. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):43-49.

### ÖZ

**Amaç:** COVID-19 tanısında kullanılan gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu (Real-time PCR) testinde test sonuçlarının güvenilir olması kritiktir. Çalışmamızda SARS-CoV-2 genomunu belirlemede Türkiye’de en sık kullanılan üç farklı ticari tanı kitinin farklı Real time-PCR sistemlerindeki uyumunun araştırılması ve bu konuda laboratuvar uzmanlarına bir bakış açısı sunulması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bu çalışmada, 46 COVID-19 hastasının kombine oro/nazofarengal sürüntü örneği kullanılmıştır. Bu örnekler SARS-CoV-2 genomunu saptamak üzere Diagnostical, Bio-Speedy ve Coronex tanı kitleri kullanılarak Rotor-Gene, Bio-Rad ve Abbott Real-time PCR cihazlarında çalışılmıştır. Çalışmalarda elde edilen Ct değerleri kaydedilmiştir. Kullanılan kitlerin cihazlar arasında yalnızca Abbott ile validasyonu bulunmamaktadır.

**Bulgular:** Çalışmamızda SARS-CoV-2 saptanmasında en düşük ve en yüksek Ct değerleri sırasıyla Rotor-Gene – Bio-Speedy ve Abbott - Diagnostical cihaz-kit ikililerinde gözlenmiştir. Düşük viral yüklü örneklerin saptanmasında da sonuç aynı bulunmuştur. Çalışmaların hepsi değerlendirildiğinde, Diagnostical kitinin diğer kitler arasında en yüksek Ct değerlerini verdiği görülmüştür.

**Sonuç:** SARS-CoV-2 saptanmasında Rotor-Gene – Bio-Speedy ikilisi ile bu ikiliye çok yakın saptanan Bio-Rad - Bio-Speedy ikilisi diğer cihaz-kit ikililerinden daha uyumlu bulunmuştur. Yanlış negatifliklerin ve yüksek Ct değerlerinin elde edilmesi erken taburculuklara veya karantinanın uygulanmamasına, böylece bulaşıcılığın artmasına neden olabilir. Bu nedenle, Diagnostical kitinin çalışmamızdaki Real-time PCR cihazlarında saptanan değişken performansının da gösterdiği gibi, bir PCR kitinin rutin tanı amaçlı kullanımı planlandığında, laboratuvarında kullanılacağı cihazla uyumluluğunun değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Tanısal Testler, PCR, SARS-CoV-2

### ABSTRACT

**Objective:** Reliability of test results is critical in the Real-time PCR test used in the diagnosis of COVID-19. In our study, we aimed to investigate the compatibility of the three most commonly used commercial diagnostic kits in Turkey in determining the SARS-CoV-2 genome in different Real-time PCR systems and to provide a perspective to laboratory experts in this regard.

**Methods:** In this study, oro/nasopharyngeal swab samples of 46 COVID-19 patients were used. The samples were analyzed on Rotor-Gene, Bio-Rad and Abbott Real-time PCR devices using Diagnostical, Bio-Speedy and Coronex diagnostic kits to detect SARS-CoV-2 genome. The Ct values were recorded. The kits used were all validated with the devices except with Abbott, only.

**Results:** The highest and the lowest Ct values were observed in the Abbott–Diagnostical and the Rotor-Gene–Bio-Speedy pairs, respectively. The same result was found in samples with low viral load in the study. When all assessments were evaluated, it was observed that Diagnostical kit gave the highest Ct values among the kits.

**Conclusion:** For SARS-CoV-2 detection, the pairs of the Rotor-Gene and Bio-Speedy, and the Bio-Rad–Bio-Speedy were found to be more compatible than the other device-kit pairs. False negative results or high Ct values may lead to early discharge of patients or quarantine failures, which may increase the infection. Thus, as the different performances of Diagnostical kit on the three Real-time PCR instruments indicates, when a PCR kit is planned for routine diagnostic use, it is crucial to assess its compatibility with the instrument in the laboratory.

**Keywords:** Reagent Kits, Diagnostic, PCR, SARS-CoV-2

**Alındığı tarih / Received:**

19.08.2024 / 19.August.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**

01.12.2024 / 01.December.2024

**Yayın tarihi / Publication date:**

24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

H. Albayrak 0000-0002-0753-7818

F. Y. Zeyrek 0000-0001-7386-9944

A. Yiğın 0000-0001-9758-1697

✉ haticealb@hotmail.com

## GİRİŞ

Coronaviridae ailesinde incelenen SARS-CoV-2, 2019 yılında Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmış, virüsün neden olduğu COVID-19 DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından Mart 2020'de pandemi olarak ilan edilmiştir<sup>(1,2)</sup>. Virüs bugüne kadarki süreçte yeni mutasyonlar geçirmeyi sürdürmekte, virüsün küresel verileri DSÖ tarafından yakından izlenmektedir<sup>(3)</sup>.

COVID-19 için temel hedef, virüsün yayılmasını önlemek ve hastalığa karşı etkin klinik yaklaşımları tanımlamaktır<sup>(4)</sup>. Bulaşı önlemek ve erken tedavi sunabilmek, enfekte kişilerin erken ve doğru bir şekilde tespit edilmesiyle mümkündür. Bu noktada DSÖ, COVID-19 laboratuvar tanısında güvenilir tanı yöntemi olarak Real-time RT-PCR (Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yönteminin de dâhil olduğu nükleik asit amplifikasyon testlerini (NAAT) önermektedir<sup>(5)</sup>. Pandemi sürecinde PCR testleri enfekte kişilerle temaslı hastaların takibinde, asemptomatik hastaların saptanmasında, karantina kararlarının uygulanmasında veya kaldırılmasında, cerrahi öncesi taramalarda dünya genelinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu sebeple testlerin pozitifliği de negatifliği de önem arz etmektedir<sup>(6,7)</sup>.

Pandemi hazırlığında en önemli noktalardan biri, yeni etken suşun laboratuvarında saptanabilirliğidir<sup>(8)</sup>. Bu amaçla atılabilecek adımlardan biri, kullanılan PCR testlerinin veriminin ve bu verimi etkileyen değişkenlerin araştırılması olabilir. Çalışmamızda, bu değişkenlerden olan cihaz-kit uyumlarına ışık tutmak amacıyla, SARS-CoV-2 genom saptanmasında ülkemizde yaygın olarak kullanılan farklı ticari tanı kitlerinin farklı Real-time PCR cihazlarındaki performansı incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Harran Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (07.06. 2021 tarih ve HRU/21.11.30 sayı) onaylanmıştır.

**Örnekleme:** Çalışmamızda hastanemize başvuran COVID-19 pozitif 46 hastadan tekrar kombine oro-nazofarengeal sürüntü örneği kullanılmıştır. Hastaların 24'ü ayakta, 15'i yatan, 7'si yoğun bakım hastasıdır.

**Örneklerin saklanması:** Laboratuvarımızda rutinde kullanılan vNAT (Viral Nükleik Asit Tamponu. Bioeksen Ltd, İstanbul, Türkiye) taşıma tüpleri örneklerin laboratuvara taşınmasında ve saklanmasında kullanılmıştır. vNAT taşıma tüpünde virüsün inaktivasyonunu, viral RNA salınımını ve korunmasını sağlayan bir sıvı bulunmaktadır. Bu nedenle örneklerin ekstraksiyonu, üretici önerileri doğrultusunda, örneklerin vNAT ekstraksiyon tamponu ile vortekslenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ardından örnekler homojen olarak alikotlara ayrılıp etiketlenerek, çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

**Çalışma koşulları:** Real-time PCR testleri Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya), Bio-Rad CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, ABD) ve Abbott m2000rt (Abbott Molecular Diagnostics, ABD) cihazlarında Bio-Speedy SARS-CoV-2 Double Gene RT-qPCR kit (Bioeksen Ltd, İstanbul, Türkiye), DS Coronex COVID-19 multiplex RT-qPCR detection kit (DS Bio and Nano Technology, Ankara, Türkiye) ve Diagnovital HS SARS-CoV-2 multiplex Real-time PCR kit (RTA, Türkiye) kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitlerin hedef genleri ve LOD (En düşük analit miktarı) değerleri tabloda sunulmuştur (Tablo 1).

Her bir kit aynı örneklerin homojen alikotları kullanılarak her bir cihazda çalışılmıştır. Yapılan her bir

**Tablo 1. Kullanılan kitlerin hedef genleri ve en düşük analit miktarı (LOD) değerleri**

Kit	Hedef Gen	LOD	İnternal Kontrol
Coronex	Orf1ab + N genleri	100 kopya/ml	RNaseP geni
Bio-Speedy	Orf1ab + N genleri	200 kopya/ml	RNaseP geni
Diagnovital	N geni	206 kopya/ml	RNaseP geni

yüklemeye, her bir örnek ikişer kez çalışılmıştır. Her çalışmada iki negatif, iki pozitif kontrol kullanılmıştır. Çalışmalar üretici talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen döngü eşik (Ct: Cycle Threshold) değerleri kaydedilmiştir.

Düşük viral yüke sahip örneklerin farklı çalışmalarda yalnızca negatif bulunup bulunmayacağını gözlemlemek amacıyla, çalışmadaki en düşük viral yüke sahip yedi hasta örneği seçilmiştir. Bu seçim için, çalışmamızda elde edilen standart lineer eğri kullanılmış, en düşük ve altı haneli viral yükü olan tüm örnekler seçime dahil edilmiştir. Ardından, bu yedi örneğin Ct değerleri incelenmiştir.

**Standart lineer eğrinin eldesi:** Standart lineer eğrinin eldesi ve kantitasyonda kullanılması amacıyla MOTAKK dış kalite kontrol programı kapsamında gönderilen CoV-2-K2201.03 Kodlu örnek kullanılmıştır (1.080.000 kopya/ml). Örnek ½ oranında altı defa sulandırılmış, bu sulandırmalar altı kuyucuk halinde Rotor-Gene RTqPCR cihazına Bio-Speedy tanı kiti kullanılarak yüklenmiştir. Yüklemede, örneğin viral RNA yük miktarı her bir kuyucukta ½ oranında azaltılarak cihaza tanımlanmış ve bu altı kuyucuk kullanılarak standart lineer eğri cihazda elde edilmiştir.

**İstatistiksel analiz:** Tüm veri analizleri Windows için SPSS 24.0 (SPSS Inc, NY, ABD) ve JMP Ver.14 (The JMP Equipment Company, SAS, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. Güç analizi testinde örnek sayımız hasta popülasyonunu temsil etmesi için yeterli bulunmuştur. Veriler (cihaz ve kitler için) sırasıyla Levene testi ve Shapiro-Wilk testi ile varyansların eşitliği ve normallik varsayımı için istatistiksel olarak analiz edilmiştir ( $p>0.05$ ). Daha sonra veriler (cihaz ve kitler için) GLM (General Lineer Model) ve Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gruplar arasında farklılığın olup olmadığını belirlemek için analiz edilmiştir. İki değişken arasındaki ilişkinin yönünü ve büyüklüğünü belirlemek için Pearson korelasyon analizi uygulanmıştır. Veriler ortalama ve standart

sapma olarak sunulmuştur. Önem düzeyi, tüm testler için  $p<0.05$ 'te değerlendirilmiştir.

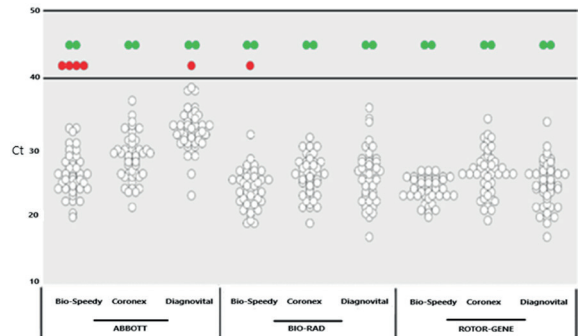
## BULGULAR

COVID-19 pozitif hastaların sürüntü örnekleri Abbott, Bio-Rad ve Rotor-Gene Real-time PCR cihazlarına Bio-Speedy, Diagnovital ve Coronex tanı kitleri kullanılarak yüklenmiştir. Bio-Speedy kitinin kullanıldığı Abbott cihazı yüklemesinde dört örnek negatif bulunmuştur.

Şekil 1'de tüm cihaz-kit ikililerinde elde edilen Ct değerleri görülmektedir.

Hem cihazların hem de kitlerin aralarında Ct değerleri açısından anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ( $p<0.001$ ). Cihaz-kit ikilileri arasında en yüksek ortalama Ct değeri Diagnovital – Abbott ikilisinde ( $32.53\pm 0.43$ ), en düşük ise Bio-Speedy - Rotor-Gene ikilisinde ( $23.87\pm 0.26$ ) bulunmuştur (Tablo 2).

Cihaz-kit ikilileri Ct değerlerine bakılarak karşılaştırıldığında, Rotor-Gene - Bio-Speedy ikilisinde  $<24$  Ct değeri veren 23 örnek bulunmuştur. Abbott - Diagnovital ikilisinde  $>34$  Ct değeri veren 12 örnek tespit edilmiştir (Tablo 3).



Şekil 1. Cihaz-kit ikililerinden elde edilen Ct değerleri. İçi boyasız noktalar pozitif bulunan örneklerin Ct değerlerini, yeşil noktalar negatif kontrolleri, kırmızı noktalar yalnızca negatifleri ifade etmektedir.

**Tablo 2. Her bir kitin cihazlarda elde edilen ortalama Ct değeri ve değerler arasındaki farkın anlamlık test sonuçları**

Cihaz	Kit			Cihaz ortalaması
	Bio-Speedy	Coronex	Diagnovital	
Abbott	26.18 ± 0.48	28.60 ± 0.49	32.53 ± 0.43	29.10 ± 0.46
Bio-Rad	23.96 ± 0.40	25.67 ± 0.42	25.94 ± 0.59	25.19 ± 0.47
Rotor-Gene	23.87 ± 0.26	26.37 ± 0.49	24.68 ± 0.49	24.97 ± 0.41
Kit ortalaması	24.67 ± 0.38	26.88 ± 0.46	27.72 ± 0.50	
	<b>Etki</b>			
	<b>Cihaz</b>	<b>Kit</b>	<b>Cihaz-Kit</b>	
p-değeri	<0.001	<0.001	<0.001	

**Tablo 3. Cihaz-kit ikililerinde aynı örneklerin yüksek veya düşük Ct değerlerinde saptanma durumları**

Ct	Bio-Rad (n)			Abbott (n)			Rotor-Gene (n)		
	Bio-Speedy*	Diagnovital*	Coronex*	Bio-Speedy*	Diagnovital*	Coronex*	Bio-Speedy*	Diagnovital*	Coronex*
<24	22	15	13	9	1	4	23	17	12
24-34	23	29	33	33	32	40	23	29	33
>34	0	2	0	0	12	2	0	0	1
Negatif	1	0	0	4	1	0	0	0	0

**Düşük viral yüklü örneklerde virüs saptanması:**

Cihaz-kit ikililerinde düşük viral yükü kaçırma durumunun incelenmesi için en düşük viral yüke sahip yedi örnek seçilmiştir. bu yedi örnek için de hem cihazlar hem de kitler arasında Ct değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05). En yüksek Ct değeri cihazlar arasında Abbott cihazında bulunmuştur. Cihaz-kit uyumları incelendiğinde, en yüksek Ct değerleri Diagnovital-Abbott ikilisinde gözlemlenmiştir (p<0.05) (Şekil 2).

**TARTIŞMA**

Çalışmamızda Bio-Speedy, Coronex ve Diagnovital kitleri ile Abbott, Bio-Rad ve Rotor-Gene Real-time PCR cihazlarında 46 hasta örneğinin analizi yapılmış, elde edilen Ct değerleri incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, tüm çalışmalar değerlendirildiğinde SARS-CoV-2 tespitinde en düşük Ct değerlerini veren kit Bio-Speedy'dir. Bunun aksine, Diagnovital kiti en yüksek Ct değerlerini vermiştir. Çalışmamızda incelenen diğer kit-cihaz ikilileri ile birlikte değerlendirildiğinde, Diagnovital kitinin

Abbott cihazı ile en yüksek Ct değerlerini vermesi, diğer cihazlarla ise daha uyumlu görülmesi dikkat çekmektedir. Bu durum, laboratuvarlarda rutin teste alınması planlanan yeni bir ticari tanı kitinin, kullanılacak olan Real-time PCR cihazı ile uyumunun değerlendirilmesinin önemini göstermektedir.

Bio-Rad CFX96 cihazı kullanılarak 9 farklı SARS-CoV-2 tanı kitinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, önceden pozitif bulunan örnekleri yakalama durumlarına göre kitlerin hassasiyeti incelenmiştir. Fast Track Diagnostics (%100), Mikrogen Diagnostik (%97), SolGent Co. Ltd. (Hedef gen SG-N için %97, SG-Orf1a için %92), Altona Diagnostics (Hedef gen AT-E için %90, AT-S için %97), BGI (%95) ve Shanghai Fosun Long March Medical Science Co. Ltd. (%94) şeklinde bulunmuştur. GmbH & Co KG, Wells BIO INC. ve Primerdesign Ltd. kitleri ise sırasıyla %49, %62 ve %86 değerleriyle en düşük duyarlılığı göstermiştir. İncelenen her bir kit farklı hedef gen bölgeleri kullanmaktadır. Araştırmacılar duyarlılıkların kitler arasında gösterdiği farklılığın, primer tasarımındaki farklılıklardan veya hedeflenen genom bölgelerinin farklı olmasından kaynaklandığını düşünmüştür<sup>(9)</sup>.

Bu yorum, Diagnostik kitinin diğer iki kitten farklı olarak Orf1ab genini hedeflemediği düşünüldüğünde, çalışmamızda nispeten yüksek Ct elde edilmesinin sebeplerinden birini açıklama niteliğindedir.

Real-time PCR çalışmalarında kullanılan testin performansı ve elde edilen Ct değerlerinin güvenilirliği oldukça önemlidir. Klinik pratikte, yüksek Ct değerleri hekimler tarafından düşük viral yükle seyreden hafif hastalığa ya da inkübasyon veya iyileşme dönemine yorumlanabilmektedir. Negatif sonuçlar ise, COVID-19 açısından izolasyon kararının verilmemesine ve hastanın enfekte olmayan hastalarla aynı hastane odasına yatırılmasına neden olabilir. Gerçekte bunlar, örnekte yüksek miktarda bulunan hedef genomun düşük test verimi nedeniyle etkin çoğaltılamaması ve yüksek Ct eldesi, ya da düşük viral yüklü örneklerde genomun hiç tespit edilememesiyle yalancı negatiflik elde edilmesi olabilir<sup>(10,11)</sup>.

Pandeminin yoğun döneminde, kaynaklar kısıtlı ve hasta sayısı karşılanamayacak kadar çok iken, hastaların taburculuğu için bir gösterge sunabilmek adına La Scola ve ark.<sup>(12)</sup> bir araştırma yapmışlardır. COVID-19 etkeninin bulaştırıcılığının incelendiği bu çalışmada, farklı Ct değerleri veren örneklerin kültürü yapılmıştır. Bulgu ilgi çekicidir: >33-34 Ct değeri veren örneklerde SARS-CoV-2 üremesi olmamıştır. Araştırmacılar bu sonuçtan yola çıkarak, bu grup hastalarda bulaştırıcılığın bittiği ve hastaların taburcu edilebileceği yorumunu yapmıştır. Bununla birlikte, farklı laboratuvarlarda kullanılan Real-time PCR süreçlerinin değişkenlik gösterebilmesi nedeniyle sonucun genellenemeyeceği yazarlar tarafından belirtilmiş, viral yük-kültür arasındaki ilişkiye her hastanenin kendi düzeninde bakması önerilmiştir. Çalışmamızdaki bulgular da farklı laboratuvarlarda görülebilecek Ct farklılıklarını vurgulamaktadır. Bu durumda karşılaşılabilecek yeni pandemilerde bu bilgi, yeni etken için güncellenerek ve uygulanacak hastanelerin laboratuvarlarında denemeleri yapılarak uygulamaya dökülebilir.

Bosna Hersek'te yapılan bir çalışmada, 30 nazofarengeal sürüntü örneği 10 farklı kit kullanılarak

Bio-Rad CFX96 Real-time PCR cihazında SARS-CoV-2 tespiti için çalışılmıştır. Bu kitlerin özgüllük ve duyarlılığı, referans kit olarak kabul ettikleri LabGun TM COVID-19 (LabGenomics) kitinin sonuçları temel alınarak saptanmıştır. Bu çalışmada duyarlılığı en yüksek kit STAT-NAT (%83), en düşük Savvgen (%46) olarak bulunmuştur. Diagnostik ve Bio-Speedy kitleri ise sırasıyla %79 ve %70 olarak bulunmuştur. >34 Ct olan örnekler içinde ise, en düşük duyarlılık Bosphore ve Bio-Speedy kitlerinde görülmüştür<sup>(13)</sup>. Bizim çalışmamızda ise bu bulgunun aksine, Bio-Speedy kiti Diagnostik'den daha duyarlı bulunmuştur. Ekstraksiyon aşamasında oluşabilecek sorunlar, elde edilen RNA'nın kalite ve miktarını etkileyerek testin verimini düşürebilir<sup>(14)</sup>. Bizim çalışmamızda COVID-19 pandemisi boyunca rutin olarak kullandığımız vNAT (Bioeksen) taşıma besiyeri, örneklerin izolasyonunda kullanılmış, gerçek bir ekstraksiyon protokolü uygulanmamıştır. Bu çalışmada ise otomatize manyetik ekstraksiyon ile RNA elde edilmiştir. Bu durum farklı sonuçların nedeni olabilir.

Kit-cihaz ikilileri arasındaki uyumu anlamak amacıyla çalışmamızda elde edilen Ct değerleri incelendiğinde, Rotor-Gene - Bio-Speedy ikilisinin diğerlerine göre en düşük Ct değerlerini verdiği, bunun aksine Diagnostik kiti ile Abbott cihazında yapılan çalışmada en yüksek Ct değerlerinin elde edildiği görülmüştür. Burada vurgulanması gereken durum, cihazlarda elde edilen Ct değerlerinin kullanılan kitlere bağlı olduğudur. Her üç kitin de Bio-Rad ve Rotor-Gene Real-time PCR cihazlarıyla validasyonu varken, Abbott sistemi ile yoktur. Bu çalışmada temel olarak, laboratuvarlarımızda kullandığımız cihazlar ile farklı kitlerin uyumunu anlamaktır.

Bulgularımıza göre, SARS-CoV-2 genom tespitinde en uyumlu cihaz-kit ikilileri, Rotor-Gene - Bio-Speedy ve buna çok yakın Ct değerleri vermesi nedeniyle Bio-Rad - Bio-Speedy olarak görülmüştür.

Son olarak, çalışmamızda en düşük viral yüke sahip yedi örneğin Ct değerleri kendi içinde değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuç ilk bulgularla uyumludur. Buna göre, düşük viral yüke sahip örnekler Abbott-Diagnostik ikilisinde çalışıldığında,

cihaz-kit uyumsuzluğu nedeniyle yalancı negatiflik elde edilebilir. Bu durum erken taburculuğa, karantinanın uygulanmamasına ve bulaşın artmasına neden olabilir.

Çalışmamızda her PCR deneyinde viral yükü belirli bir örnek ile standart eğri çizilmemiş, örneklerin homojen alikotlarının karşılaştırılması yapılmıştır. Bu durum çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. Ayrıca dünya genelinde birçok tanı kiti bulunmaktadır, ancak çalışmamızda tüm bu kitlerden bizim ülkemizde sık kullanılan üçünün, farklı PCR cihazlarıyla olan uyumları sunulmuştur. Farklı cihaz-kit ikililerinin uyumlarını değerlendiren başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Real-time PCR testlerinin performansı, kullanılan ticari PCR kitleri ve cihazlarına göre farklılık göstermekte, bunun sonucu olarak elde edilen değişken sonuçlar klinik hekimlerinin yatış, izolasyon ve taburculuk kararlarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle, yeni bir kit veya cihazın rutin tanıda kullanıma alınmadan önce performansının ve uyumunun test edilmesi kritiktir. Bu noktada, bilimsel yayınların taranması ve ilgili çalışmaların incelenmesi, laboratuvar uzmanlarına fikir verecektir. Bu bilgi birikimine katkı sağlamak amacıyla yaptığımız çalışmamızda, SARS-CoV-2 genom saptanmasında en iyi uyumun sırasıyla Rotor-Gene – Bio-Speedy ve Bio-Rad - Bio-Speedy ikililerinde gözlemlendiği saptanmıştır.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma Harran Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (07.06.2021 tarih ve HRU/21.11.30 sayı) onaylanmıştır.

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

**Finansman:** Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından #21277 protokol numarası (17 Kasım 2021) ile desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** This research was conducted with the approval of Harran University, Clinical Research Ethical Committee (06.07.2021; HRU/21.11.30).

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

**Funding:** This research was funded by Harran University, Scientific Research Projects Coordination Unit (11.17.2021; no: #21277).

## KAYNAKLAR

1. Samudrala PK, Kumar P, Choudhary K, et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *Eur J Pharmacol.* 2020;883:173375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173375>
2. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* 2020;91(1):157-60. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>
3. World Health Organization (WHO). Historical working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants. [<https://www.who.int/publications/m/item/historical-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>] (Erişim tarihi: 06.09.2023)
4. Pollard CA, Morran MP, Nestor-Kalinowski AL. The COVID-19 pandemic: a global health crisis. *Physiol Genomics.* 2020;52(11):549-57. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00089.2020>
5. World Health Organization (WHO). Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities: Interim guidance, 25 June 2021. [<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/342002/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>] (Erişim tarihi: 22.08.2023)
6. Quilty BJ, Clifford S, Hellewell J, et al. Quarantine and testing strategies in contact tracing for SARS-CoV-2: a modelling study. *Lancet Public Health.* 2021;6(3):e175-83. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(20\)30308-X](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(20)30308-X)
7. Puylaert CAJ, Scheijmans JCG, Borgstein ABJ, et al. Yield of screening for COVID-19 in asymptomatic patients before elective or emergency surgery using chest CT and RT-PCR (SCOUT): Multicenter study. *Ann Surg.* 2020;272(6):919-24. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000004218>
8. Harrington WN, Kackos CM, Webby RJ. The evolution and future of influenza pandemic preparedness. *Exp Mol Med.* 2021;53(5):737-49. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00603-0>

9. Eberle U, Wimmer C, Huber I, et al. Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(6):1303-8.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-021-04159-9>
10. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, et al. Viral dynamics and real-time RT-PCR Ct values correlation with disease severity in COVID-19. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(6):1091.  
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11061091>
11. Watson J, Whiting PF, Brush JE. Interpreting a covid-19 test result. *BMJ* 2020;369:m1808.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.m1808>
12. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(6):1059-61.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-020-03913-9>
13. Mulahuseinovic N, Salihefendic L, Durgut S, Kandic E, Konjhodzic R. Comparative analysis of SARS-CoV-2 detection kits. *Acta Inform Med.* 2022;30(2):110-4.  
<https://doi.org/10.5455/aim.2022.30.110-114>
14. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2021;516:1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.011>



# Gaziantep İlinde HBsAg Pozitif Hastalarda HDV Seroprevalansı<sup>§</sup>

## HDV Seroprevalence in HBsAg Positive Patients in Gaziantep Province

Kaan Çeylan\*<sup>©</sup>, Tekin Karşılığil\*\*<sup>©</sup>

\* Ergani Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Diyarbakır, Türkiye

\*\* Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Gaziantep, Türkiye

**Atf/Cite as:** Çeylan K, Karşılığil T. Gaziantep ilinde HBsAg pozitif hastalarda HDV seroprevalansı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2025;55(1):50-55.

### Öz

**Amaç:** Hepatit D virüsü, dış zar yapısında hepatit B virüsüne ait yüzey antijen yapısını kullandığı için, defektif bir yapıya sahiptir, ve bu nedenle taksonomide satelit virüs şeklinde adlandırılan tek zincire sahip bir RNA virüsüdür. Aktif dönem HBV enfeksiyonu olan bireylerde ko-enfeksiyon şeklinde ya da HBV taşıyıcısı olanlarda süperenfeksiyon şeklinde enfeksiyona yol açabilmektedir. HDV enfeksiyonu için ister aktif ister pasif olsun, herhangi bir profilaksi mevcut değildir, korunmada yalnızca HBV aşısı etkilidir. Ülkemiz için HDV enfeksiyonu oranı düşük bildirilmiş olmasına karşın Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ülkenin ortalamasından fazladır. Bu çalışmamızda, son bir yılda hastanemize başvuran hastaların anti-HDV pozitiflik oranı araştırılmıştır.

**Yöntem:** Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılmış olan HbsAg, Anti-HDV, Anti-Hbc-IgM testleri araştırılmış olup, elde edilen veriler retrospektif olarak analiz edilmiştir.

**Bulgular:** HBsAg istemiyle gönderilip, HbsAg sonucu reaktif saptanan 2483 hastanın anti-HDV sonuçları araştırılmış bunların 100'ünde ise anti-HDV sonucu pozitif (%4) bulunmuştur. Bu 100 hastanın 59'u erkek, 41'i kadındır. Anti-HDV pozitifliği 40-49 yaş grubunda en yüksek, 0-9 yaş aralığında en düşük seviyede saptanmıştır.

**Sonuç:** Çalışmamızda saptanan yüksek anti-HDV seroprevalansı nedeniyle HBV aşısının yapılması HDV enfeksiyonunun önlenmesi açısından önem arz etmektedir. Ayrıca aynı bölgedeki farklı merkezler arasında dahi farklı oranlarda anti-HDV pozitifliğinin saptanması nedeniyle her merkezin kendi anti-HDV pozitiflik oranlarını takip etmesi önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** HBV, HDV, prevalans

### ABSTRACT

**Objective:** Hepatitis D virus is a defective virus; it is a single-stranded RNA virus called satellite virus in taxonomy. It uses the surface antigen of hepatitis B virus on its outer membrane. It can infect together with active HBV infection (co-infection) or in HBV carriers (superinfection). There is no active or passive prophylaxis method for HDV, but HBV vaccine has been found to be effective. Although the rate of HDV infection in our country is reported to be low, it is above the national average in the Southeastern Anatolia. In this study, the prevalence of anti-HDV in patients admitted to Gaziantep University in the last year was investigated.

**Methods:** Anti-HDV, HbsAg, Anti-Hbc-IgM tests performed in Gaziantep University Faculty of Medicine Microbiology Laboratory were investigated. The obtained data were analyzed retrospectively.

**Results:** Anti-HDV antibodies of 2483 patients who were initially referred for HBsAg testing and found to be positive for HbsAg were investigated. A total of 100 of them (4%) were found to be positive for anti-HDV; 59 of these 100 patients were male and 41 were female. The highest and lowest Anti-HDV positivity rates were found in 40-49 and 0-9 age groups, respectively.

**Conclusion:** Due to the high anti-HDV seroprevalence detected in our study, HBV vaccination is important for the prevention of HDV infection. In addition, since anti-HDV positivity rates are detected at different rates even among different centers in the same region, it is important for each center to follow its own anti-HDV positivity rates.

**Keywords:** HBV, HDV, prevalence

### Alındığı tarih / Received:

26.08.2024 / 26.August.2024

### Kabul tarihi / Accepted:

06.01.2025 / 06.January.2024

### Yayın tarihi / Publication date:

24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

K. Çeylan 0000-0002-8493-2715

T. Karşılığil 0000-0001-7672-3625

<sup>§</sup>Bu araştırma, 7. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde (1-5 Kasım 2023, Bodrum) PP-161 no.lu poster olarak sunulmuştur.

✉ kaan.cheylan@gmail.com

## GİRİŞ

Hepatit D virüsü (HDV), ilk kez 1977 yılında yeni bir hepatit B virüsü (HBV) ile ilişkili antijen olarak tanımlanmıştır, daha sonradan bunun ayrı bir virüs olduğu anlaşılmıştır<sup>(1)</sup>. HDV, satelit virüs olarak adlandırılan, replikasyon için HBV'nin yüzey

antijenine (HbsAg) ihtiyaç gösteren, küçük sarmallı tek sarmallı genom içeren RNA virüsüdür<sup>(2)</sup>. HDV insanları enfekte ettiği bilinen en küçük virüsten<sup>(3)</sup>.

HDV, karaciğeri HBV ile ko-enfeksiyon ve kronik HBV enfeksiyonu hastalarında süperenfeksiyon olmak üzere iki şekilde enfekte edebilir<sup>(4)</sup>. HDV enfeksiyonu

için başlıca risk faktörleri damar içi uyuşturucu madde kullanımı, birden fazla cinsel partner, erkeklerle seks yapan erkekler, insan immünyetmezlik virüsü (HIV) ve Hepatit C (HCV) virüsü ile enfekte olmuş olmak ve yüksek prevalanslı bölgelerde bulunmak ya da bu bölgelere seyahat etmektir<sup>(5)</sup>. HDV'nin Dünya genelinde aktif olarak 70 milyonun üzerinde insanı enfekte ettiği tahmin edilmekte olup, HBV taşıyıcılarının %5'inin HDV ile enfekte olduğu belirtilmektedir<sup>(6)</sup>.

HDV enfeksiyonunun tanısı için 2 temel test mevcuttur. Bu testlerden ilki anti-HDV testi olup, bu test HDV'ye karşı total antikoları tespit ettiği için, aktif veya geçirilmiş enfeksiyon ayırımı yapamamaktadır. Tanı için kullanılan bir diğer test ise HDV-RNA saptanmasına yönelik moleküler tetkiklerdir. HDV-RNA testi aktif hastalığı doğrulamak ve klinik tanıyı teyit etmek için kullanılabilir<sup>(7)</sup>. HDV enfeksiyonu sırasında, bakılan HBV-DNA testinin düşük olması yanıltıcı olabilir. Zira aktif HDV enfeksiyonu sırasında HBV-DNA düzeyinde baskılanma görülebilir<sup>(8)</sup>. Tanı sonrası, HBV ile ko-enfeksiyon ya da süperenfeksiyon ayırımını yapmak son derece önemlidir. HDV tanı parametreleri ile birlikte HBV'nin kor antijenine karşı IgM yapısında antikoların (Anti-Hbc-IgM) saptanması, ko-enfeksiyon lehine iken, anti-Hbc-IgM negatifliği daha çok süperenfeksiyon lehine yorumlanmaktadır<sup>(8,9)</sup>.

HDV için spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Adefovir, Tenofovir ve Entecovir gibi HBV'ye karşı etkili antiviraller de işe yaramamaktadır. Genel olarak etkinliği zayıf olmasına rağmen interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) kullanılmaktadır<sup>(10)</sup>. IFN- $\alpha$  tedavisinin etkinliğinin zayıf olmasının başlıca nedeni de HbsAg serokonversiyonunun gelişmemiş olmasıdır. HbsAg serokonversiyonu gelişmediği takdirde, oldukça sık HDV relapsları görülmektedir<sup>(11)</sup>. HDV enfeksiyonunu tedavisinin oldukça zor olmasının nedenlerinden birisi, HBV ile sıkı etkileşimi ve HBV yokluğunda bile varlığını sürdürebilme yeteneğidir<sup>(12)</sup>.

Ülkemizde HDV enfeksiyonunun azalma eğiliminde olduğu bildirilmesine rağmen, özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde halen ciddi bir sağlık sorunu olduğu bildirilmektedir<sup>(13)</sup>. Çalışmamızda

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin en büyük şehirlerinden birisi olan Gaziantep'te hepatit B hastalarında anti-HDV pozitifliği araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Gaziantep Üniversitesi, Müdahalesiz Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu tarafından (28.02.2024 tarih ve 2024/26 sayı) onaylanmıştır.

1 Mayıs 2022 ve 12 Mayıs 2023 tarih aralığında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı bünyesinde çalışılan HbsAg, Anti-HDV, Anti-Hbc-IgM parametreleri geriye dönük olarak incelenmiştir. HbsAg ve Anti Hbc-IgM parametreleri Alinity-i (Abbott, ABD) cihazında Reagent kiti (Abbott, ABD) kullanılarak, Anti-HDV parametresi HDV Ab kiti (DIA.PRO, İtalya) kullanılarak, Analyzer I (Euroimmun, Almanya) cihazında çalışılmıştır. Elde edilmiş olan veriler retropektif bir şekilde analiz edilmiştir. Hastaların takipleri farklı merkezlerde de yapılabildiği için anti-HDV pozitif saptanan her hastada moleküler test ile viral yük tayini yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmaya moleküler test sonuçları dahil edilmemiştir. HDV antijeni ise çalışılmamıştır.

## BULGULAR

1 Mayıs 2022 ve 12 Mayıs 2023 tarihleri arasında 2483 hastaya ait HbsAg testi reaktif olarak saptanmıştır. HbsAg sonucu reaktif saptanan hastaların 770'i (%31) erkek, 1713'ü (%69) kadındır. HbsAg reaktif hastaların yaş grubu dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir.

HbsAg sonucu reaktif saptanan ise 100 hastanın Anti-HDV sonucu reaktif (%4.0) olarak saptanmıştır. Bunların 59'u erkek, 41'i ise kadındır. Anti-HDV reaktifliklerini yaş grup dağılımına göre göre incelediğimizde en yüksek Anti-HDV reaktiflik 30 hasta (%6.6) ile 40-49 yaş arasında, en düşük Anti-HDV reaktifliği ise 1 hasta (%0.3) ile 0-9 yaş grubunda bulunmuştur. Hastaların yaş grup aralıkları açısından dağılımı ve yaş grup aralıklarına göre anti-HDV reaktiflik oranı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Yaş gruplarına göre Anti-HDV reaktiflik oranı

Yaş grubu	Reaktif anti-HDV sayısı	HbsAg reaktif hasta sayısı	Anti-HDV reaktiflik oranı (%)
0-9	1	286	0.3
10-19	2	192	1
20-29	9	260	3.5
30-39	12	385	3.1
40-49	30	456	6.6
50-59	26	470	5.5
60-69	15	304	5.0
70 ve üzeri	5	130	3.8

Anti-HDV sonucu reaktif bulunmuş hastalarda Anti-Hbc-IgM sonucu reaktif bulunan hasta olmamıştır. Bu doğrultuda anti-HDV reaktif bulunan hastalardaki HDV enfeksiyonu süperenfeksiyon şeklinde yorumlanmıştır.

## TARTIŞMA

Küresel ölçekte HDV enfeksiyonunun hafife alındığı bildirilmektedir. Hassas ve güvenilir tanı testlerine erişimin her geçen gün kolaylaşıyor olması, HDV enfeksiyonunun, özellikle gelişmekte olan, birçok ülkede halen endemik olduğunu göstermektedir<sup>(5)</sup>.

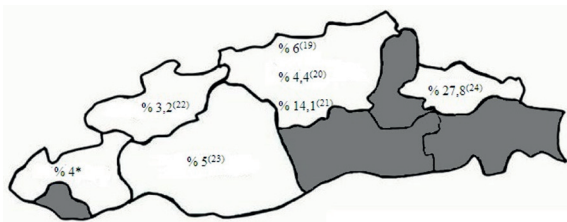
Çalışmamızda en düşük anti-HDV pozitiflik oranı %0.3 ile 0-9 yaş arası grupta, en yüksek oran ise %6.6 ile 40-49 yaş arasında saptanmıştır. Ziver Sarp ve ark.<sup>(14)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada da en düşük anti-HDV pozitifliği 0-9 yaş aralığında (%0), en yüksek anti-HDV pozitifliği ise 49-59 yaş grubunda (%10.1) saptanmıştır. Kırca ve ark.<sup>(15)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada ise en düşük anti-HDV pozitiflik oranı 20-30 yaş arası (%7) ile 71 yaş ve üzerinde (%7) saptanmış; en yüksek anti-HDV pozitiflik oranı ise 51-60 yaş aralığında (%26) saptanmıştır. Ancak bu çalışmada dahil edilen hastalar 22 yaş ve üzerindeki bireylerden oluşmaktadır. Eryıldız ve ark.<sup>(16)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada da anti-HDV pozitifliğinin en düşük olduğu yaş grubu 0-19 yaş (%3), en yüksek olduğu yaş grubu ise 60 yaş ve üzeri (%28.8) olarak saptanmıştır. Çalışmamız ve farklı çalışmalar incelendiğinde anti-HDV pozitifliğinin düşük olduğu yaş grubunun çocuk ve gençlerden oluştuğu, en yüksek görüldüğü yaş grubunun ise orta ileri yaş grubu olduğu

görülmektedir. Bu durum kronik HBV enfeksiyonunun da orta yaş grubunda daha fazla görülmesinden kaynaklanıyor olabilir. Ülkemizde Hepatit B için aşılama çalışmaları 1999 yılında başlamıştır<sup>(17)</sup>. Hepatit B aşısının HDV enfeksiyonu için koruyucu olduğu göz önünde bulundurulduğunda, neden HDV seroprevalansının çocuklar ve gençler arasında daha düşük olduğu anlaşılmaktadır.

Son yıllarda ülke genelinde HDV prevalansı azalmakta olsa da Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde halen yüksek seyrettiği bildirilmektedir<sup>(13)</sup>. Vlachogiannakos ve ark.<sup>(5)</sup> tarafından yapılan bir meta-analizde, Türkiye'de 1997 ve 2003 yılları arasında yapılan 12 çalışma incelenmiştir. Bu derlemede, ülkemizde anti-HDV seroprevalansının en yüksek olduğu bölgesinin %27.1 ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi olduğu belirtilmiştir. Toy ve ark.<sup>(18)</sup> tarafından yapılan bir başka meta-analizde ise anti-HDV seroprevalansı Marmara ve Ege bölgelerinde %3.44; Karadeniz, İç Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde %2.09; Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde ise %9.81 olarak saptanmıştır. Her iki meta-analizde de ülkemizde anti-HDV pozitifliği açısından en yüksek pozitiflik oranına sahip olan bölgenin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri olduğu görülmektedir. Yine farklı çalışmalarda ülkemizde en yüksek HDV prevalansına sahip bölgenin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri olduğu belirtilmektedir. Gaziantep Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran HbsAg sonucu reaktif saptanan 2483 hasta ile yapılan çalışmamızda anti-HDV seroprevalansı %4 olarak bulunmuştur. Bu oran yapılan meta-analizlerde Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri için verilen anti-HDV pozitiflik oranından oldukça düşüktür. Ancak çalışmamızın

yapıldığı zaman ile meta-analizlerin yapıldığı zaman dilimleri farklı olduğu için Güneydoğu Anadolu bölgesindeki şehirlerde yapılan farklı çalışmalarını da incelemeye gerek duyduk.

Güneydoğu Anadolu bölgesinde anti-HDV seroprevalansını saptamak için Celen ve ark.<sup>(19)</sup> tarafından 2006 yılında Diyarbakır'da yapılan bir çalışmada, asemptomatik HbsAg taşıyıcılarında anti-HDV pozitiflik oranı %6; kronik aktif hepatit B enfeksiyonlu bireylerde anti-HDV pozitiflik oranı ise %27.5 olarak bulunmuş; Ayaz ve Sarı<sup>(20)</sup> tarafından 2019 yılında Diyarbakır ilinde yapılan bir çalışmada anti-HDV pozitiflik oranı %4.44 olarak bulunmuş; Bekçibaşı ve ark.<sup>(21)</sup> tarafından 2022 yılında yine Diyarbakır'da yapılan başka bir çalışmada anti-HDV pozitiflik oranı %14.1 olarak saptanmıştır. Kölgeliler ve ark.<sup>(22)</sup> tarafından 2013 yılında Adıyaman'da yapılan bir çalışmada anti-HDV pozitiflik oranı %3.2 olarak saptanmış; Uyanıkoğlu ve ark.<sup>(23)</sup> Tarafından 2015 yılında Şanlıurfa'da yapılan bir çalışmada anti-HDV pozitiflik oranı %5 olarak saptanmış; Bal<sup>(24)</sup> tarafından 2021 yılında Siirt'te yapılan bir araştırmada anti-HDV pozitiflik oranı %27.8 olarak tespit edilmiştir. Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde anti-HDV seroprevalansının %3.2 ile %27.5 arasında değiştiği görülmektedir (Şekil 1). Bölgede yapılan çalışmalarda anti-HDV seroprevalansının bu kadar büyük bir aralıkta saptanmış olması, çalışmaların yapıldığı tarihteki tanı testlerinin yaygınlığına ve güvenilirliğine, illerin sosyo-ekonomik ve kültürel gelişmişlik düzeylerine, çalışmalara dahil edilen hasta sayısının farklılığına bağlıdır.



Şekil 1. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan çalışmalarda saptanan anti-HDV reaktiflik oranları. Kaynaklar şekil içinde verilmiştir.

\* Çalışmamızda elde edilen anti-HDV reaktiflik oranı

Ülkemizin farklı bölgelerinde anti-HDV seroprevalansını araştıran çeşitli araştırmalar da incelenmiştir. 2012 yılında Kose ve ark.<sup>(25)</sup> tarafından İzmir'de yapılan bir çalışmada HbsAg pozitif bireylerde anti-HDV-IgM pozitiflik oranı %2.5 olarak; Dulger ve ark.<sup>(26)</sup> tarafından 2014 yılında Van'da yapılan bir çalışmada, HbsAg pozitif bireylerde anti-HDV seroprevalansı %15.2 olarak; Karadağ ve ark.<sup>(27)</sup> tarafından 2014 yılında Samsun'da yapılan bir çalışmada anti-HDV seroprevalansı %1.56 olarak; Sahin ve ark.<sup>(28)</sup> tarafından 2018 yılında Elazığ'da yapılan bir çalışmada anti-HDV seroprevalansı %9.6 olarak; Aydemir ve ark.<sup>(29)</sup> tarafından 2019'da Sakarya'da yapılan bir çalışmada anti-HDV seroprevalansı %1.4 olarak; Ergen ve ark.<sup>(30)</sup> tarafından 2020 yılında İstanbul'da yapılan bir çalışmada anti-HDV seroprevalansı %2.9 olarak; Kırca ve ark.<sup>(15)</sup> tarafından 2023 yılında Ankara'da yapılan bir çalışmada anti-HDV seroprevalansı %2.7 olarak; Tanrıverdi Çaycı ve ark.<sup>(31)</sup> tarafından 2023 yılında Samsun'da yapılan bir çalışmada ise anti-HDV seroprevalansı %1.02 olarak bulunmuştur.

Ülkemizin Güneydoğu Anadolu bölgesi dışında kalan çeşitli şehirlerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde anti-HDV seroprevalansı %1.4 ile %15.2 arasında değişmektedir. En yüksek seroprevalans oranları ise Doğu Anadolu bölgesinde yapılan çalışmalarda saptanmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz %4'lük seroprevalans oranı Doğu Anadolu bölgesinde saptanan oranlardan sonra en yüksek seroprevalans oranı olmasına rağmen Doğu Anadolu bölgesinin dışındaki çalışmalarda saptanan seroprevalans oranına yakın saptanmıştır. Hem Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılan çalışmalar, hem de ülkemizin farklı şehirlerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde en yüksek anti-HDV seroprevalans oranlarının Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde görülmesi tespit edilmektedir. Fakat Güneydoğu Anadolu bölgesinin en büyük şehirlerinden biri olan Gaziantep'te saptanmış olduğumuz %4'lük anti-HDV pozitifliği, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde saptanan anti-HDV pozitiflik oranlarının altında, Türkiye ortalamasına yakın seyretmektedir. Bu da, yapılan çalışmaların bölge genelinde seroprevalans oranları

ile ilgili bilgi vermesine rağmen, aynı bölgedeki farklı şehirler arasında dâhi değişiklik gösterdiğini vurgulamaktadır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda HbsAg pozitif bireylerde anti-HDV seroprevalansı oldukça yüksek seyretmektedir. Çalışmamızda da %4'lük anti-HDV pozitiflik oranı saptanmıştır. HDV enfeksiyonu için aktif bir aşı mevcut değildir. Ancak HBV aşısı HbsAg taşıyıcılığını azalttığı için HDV'ye karşı ciddi bir koruma sağlamaktadır<sup>(32)</sup>. Ülkemizde Hepatit B aşılamaya çalışmaları 1999 yılında başlamıştır<sup>(17)</sup>. Bu nedenle HDV seropozitifliği çocuk ve gençler arasında oldukça düşük seyretmektedir. Ülkemizde saptanan yüksek anti-HDV pozitiflik oranları göz önünde bulundurulduğunda, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri başta olmak üzere HBV aşısının önemi daha da net bir şekilde anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, bölgesel çalışmalar anti-HDV seroprevalansı açısından fikir verse dahi, tüm merkezlerin anti-HDV seroprevalanslarını takip etmesi uygun olacaktır. Ayrıca HbsAg pozitif bireylerde anti-HDV seroprevalansının araştırıldığı hiçbir çalışmada anti-HDV seroprevalansı %1'in altında saptanmamıştır. Bu da ciddi bir anti-HDV pozitifliğini gösterdiği için imkanların uygun olduğu tüm merkezlerde HbsAg pozitif bireylerde anti-HDV testinin de yapılmasının uygun bir yaklaşım olacağı sonucunu ortaya koymaktadır. HDV için henüz etkili bir tedavinin mevcut olmayışı, yüksek anti-HDV seroprevalansı ve HBV aşısının HDV'ye karşı koruyuculuğu göz önünde bulundurulduğunda HBV aşısının düzenli uygulanması ülkemiz için bir zaruriyettir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma, Gaziantep Üniversitesi, Müdahalesiz Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu tarafından (28.02.2024 tarih ve 2024/26 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, Non-invasive Clinical Research Ethics Committee (02.28.2024; 2024/06).

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

**Funding:** None/not declared.

## KAYNAKLAR

1. Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 1977;18(12):997-1003. <https://doi.org/10.1136/gut.18.12.997>
2. Sureau C, Guerra B, Lanford RE. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol*. 1993;67(1):366-72. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.1.366-372.1993>
3. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(10):6124-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.6124>
4. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(11):a021550. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021550>
5. Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV. New epidemiology of hepatitis delta. *Liver Int*. 2020;40(Suppl 1):48-53. <https://doi.org/10.1111/liv.14357>. PMID: 32077599
6. Miao Z, Zhang S, Ou X, et al. Estimating the global prevalence, disease progression, and clinical outcome of hepatitis delta virus infection. *J Infect Dis*. 2020;221(10):1677-87. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz633>
7. Dunn R, Wetten A, McPherson S, Donnelly MC. Viral hepatitis in 2021: the challenges remaining and how we should tackle them. *World J Gastroenterol*. 2022;28(1):76-95. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i1.76>
8. Lange M, Zaret D, Kushner T. Hepatitis delta: Current knowledge and future directions. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2022;18(9):508-20.

9. Niro GA, Ferro A, Cicerchia F, Brascugli I, Durazzo M. Hepatitis delta virus: from infection to new therapeutic strategies. *World J Gastroenterol.* 2021;27(24):3530-42. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i24.3530>
10. Rizzetto M. Targeting hepatitis D. *Semin Liver Dis.* 2018;38(1):66-72. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1621711>
11. Yurdaydin C, Idilman R. Therapy of delta hepatitis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(10):a021543. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021543>
12. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis delta virus. *J Hepatol.* 2023;79(2):433-60. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.05.001>
13. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Viral Hepatit Önleme ve Kontrol Programı 2018-2023. Ankara; 2018:13.
14. Ziver Sarp T, Dinç HÖ, Özbey D, ve ark. Hepatit delta virüsü enfeksiyonu seroprevalansının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *CBU-SBED.* 2021;8(3):495-502. <https://doi.org/10.34087/cbusbed.901563>
15. Kırca F, Aydoğan S, Güvenç F, Güler E, Salman E, Dinç B. Ankara bölgesindeki hepatit delta virüs seroprevalansının retrospektif değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2023;53(2):93-8. <https://doi.org/10.54453/TMCD.2023.15045>
16. Eryıldız C, Özgün E, Yuluğkural Z, Tezel A, Şakru N. HBsAg pozitif hastalarda hepatit delta virüsü seroprevalansının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2022;52(3):232-9. <https://doi.org/10.54453/TMCD.2022.32448>
17. Tosun SY. Ülkemizde hepatit B aşılması. *STED.* 2002;11(4):140-2.
18. Toy M, Güler B, Somay K, Gençdal G, Yurdaydin C. Hepatitis delta virus infection in Turkey: A meta-analysis of prevalence. *IJID Reg.* 2024;10:228-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijregi.2024.02.003>
19. Celen MK, Ayaz C, Hosoglu S, Geyik MF, Ulug M. Anti-hepatitis delta virus seroprevalence and risk factors in patients with hepatitis B in Southeast Turkey. *Saudi Med J.* 2006;27(5):617-20.
20. Ayaz C, Sarı T. Treatment results of chronic delta hepatitis patients. *Ortadoğu Med J.* 2019;11(1):73-7. <https://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.494395>
21. Bekçibaşı M, Arslan E. Anti-HDV Seroprevalence among patients with chronic hepatitis B infection in Diyarbakır. *Viral Hepatitis J.* 2022;28(2):89-93. <https://doi.org/10.4274/vhd.galenos.2022-2021-8-1>
22. Kölgeliler S, Aktuğ Demir, Özçimen S. Adıyaman'da HBsAg pozitif kişilerde delta hepatit seropozitifliği. *Viral Hepatitis J.* 2013;19(1):8-10. <https://doi.org/10.4274/Vhd.13008>
23. Uyanıkoğlu A, Sert U, Çetin B, Uyanıkoğlu H, Yenice N. The distribution clinical and demographic features of HBsAg positive patients in Şanlıurfa Region. *Viral Hepatitis J.* 2015;21(3):89-93. <https://doi.org/10.4274/vhd.54227>
24. Bal T. Siirt ilinde yüksek hepatit delta antikoru sıklığı. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2021;11(1):45-9. <https://doi.org/10.33631/duzcesbed.740550>
25. Kose S, Ece G, Gozaydin A, Turken M. Study on seroprevalence of hepatitis delta in a regional hospital in western Turkey. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6(11):782-5. <https://doi.org/10.3855/jidc.1749>
26. Dulger AC, Suvak B, Gonullu H, et al. High prevalence of chronic hepatitis D virus infection in Eastern Turkey: urbanization of the disease. *Arch Med Sci.* 2016;12(2):415-20. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.52030>
27. Karadag A, Yılmaz H, Gören İ, Acuner İÇ, Eroglu C, Günaydın M. Defining the delta virus positivity in hepatitis B virus infections. *Viral Hepatitis J.* 2014;20(2):64-6. <https://doi.org/10.4274/vhd.63935>
28. Sahin A, Gurocak S, Tunc N, et al. Anti-HDV seroprevalance among patients with previous HBV infection. *North Clin Istanbul.* 2018;5(2):132-8. <https://doi.org/10.14744/nci.2018.01328>
29. Aydemir Ö, Terzi HA, Karakeçe E, Köroğlu M, Altındış M. Hepatit B virüsü ile infekte hastalarda delta hepatit pozitifliği; koinfeksiyon mu, süperinfeksiyon mu? *Flora.* 2019;24(2):131-5. <https://doi.org/10.5578/flora.67957>
30. Ergen P, Karadağ FY, Aydın Ö. Investigating the prevalence of hepatitis delta and assessment of treatment response. *Viral Hepatitis J.* 202;26(3):135-40. <https://doi.org/10.4274/vhd.galenos.2020.2020.0025>
31. Tanrıverdi Çaycı Y, Ülker KH, Al-Furais S, Birinci A. HBsAg Pozitif Kişilerde Anti-HDV Seropozitifliğinin Değerlendirilmesi. *Ondokuzmayıs Tıp Dergisi.* 2023;2(1):1-3.
32. Caviglia GP, Ciancio A, Rizzetto M. A review of HDV infection. *Viruses.* 2022;14(8):1749. <https://doi.org/10.3390/v14081749>

# İki Farklı COVID-19 Aşısı Sonrası Oluşan IFN- $\gamma$ ve IgG Antikor Düzeylerinin Karşılaştırılması

## Comparison of IFN- $\gamma$ and IgG Antibody Levels After Two Different COVID-19 Vaccines

Betül Dönmez Gökboğa<sup>\*@</sup>, Şükrü Öksüz<sup>\*\*@</sup>, Emel Çalışkan<sup>\*\*@</sup>, Cihadiye Elif Öztürk<sup>\*\*\*@</sup>, Nagihan Ege<sup>\*\*\*\*@</sup>,  
Eda Acar<sup>\*\*@</sup>, Banu Hümeýra Keskin<sup>\*\*\*\*\*@</sup>

\* Van Halk Sağlığı Laboratuvarı, Tıbbi Mikrobiyoloji, Van, Türkiye

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

\*\*\* İstanbul Arel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

\*\*\*\* Düzce Atatürk Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Düzce, Türkiye

\*\*\*\*\* Zonguldak Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Zonguldak, Türkiye

**Atıf/Cite as:** Dönmez Gökboğa B, Öksüz Ş, Çalışkan E, et al. İki farklı COVID-19 aşısı sonrası oluşan IFN- $\gamma$  ve IgG antikor düzeylerinin karşılaştırılması. Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 2025;55(1):56-62.

### Öz

**Amaç:** Çalışmamızın hedefi, CoronaVac ile BioNTech aşısı uygulamalarından sonra meydana gelen, hücresel ve humoral bağışıklığın belirteci olan interferon-gama ile immüoglobulin G antikor seviyelerinin kıyaslanmasıdır. **Yöntem:** Çalışmamızda ikişer doz olarak CoronaVac aşısı uygulanmış 18 gönüllü ve BioNTech aşısı uygulanmış 22 gönüllünün serumlarından Anti-SARS-CoV-2 IGRA testi ile IFN- $\gamma$  cevabı ve SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent testi ile IgG antikor cevabı araştırılmıştır.

**Bulgular:** Araştırmamıza dahil edilen aşı grupları arasında IFN- $\gamma$  yanıtı açısından anlamlı seviyede fark tespit edilirken ( $p=0.007$ ), IgG antikor yanıtı açısından ise anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ). Her iki aşı grubundaki immün yanıtlar kantitatif olarak değerlendirildiğinde ise, IFN- $\gamma$  ve IgG antikor yanıtı BioNTech aşısı grubunda, CoronaVac aşısı grubunda tespit edilen sonuçlardan anlamlı seviyede daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ).

**Sonuç:** Interferon gama salınım testinin(IGRA) temel avantajı, özel ekipmana gereksinim olmadan ve çok kısa süre içerisinde gerçekleştirilme imkanı olmasıdır. COVID-19'da aşı cevabı için antikor tetkikleri sıkça kullanılmasına karşın, T hücre yanıtını tespit eden Anti-SARS-CoV-2 IGRA tetkiki de güvenilir bir metod olarak kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2, COVID-19 aşısı, interferon-gama

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of our study is to compare the levels of interferon-gamma and immunoglobulin G antibodies, which are markers of cellular and humoral immunity, that occur after CoronaVac and BioNTech vaccine applications.

**Methods:** In our study, IFN- $\gamma$  response was investigated with Anti-SARS-CoV-2 IGRA test and IgG antibody response with SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent test from the sera of 18 volunteers who were administered two doses of CoronaVac vaccine and 22 volunteers who were administered BioNTech vaccine.

**Results:** While a significant difference was detected in terms of IFN- $\gamma$  response between the vaccine groups included in our study ( $p=0.007$ ), no significant difference was detected in terms of IgG antibody response ( $p>0.05$ ). When the immune responses in both vaccine groups were evaluated quantitatively, IFN- $\gamma$  and IgG antibody responses were significantly higher in the BioNTech vaccine group than in the CoronaVac vaccine group ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ , respectively).

**Conclusion:** The main advantage of the interferon gamma release test (IGRA) is that it can be performed without the need for special equipment and in a very short time. Although antibody tests are frequently used for vaccine response in COVID-19, the Anti-SARS-CoV-2 IGRA test, which detects T cell response, can also be used as a reliable method.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19 vaccine, Interferon-gamma

**Alındığı tarih / Received:**  
04.03.2024 / 04.March.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**  
06.01.2025 / 06.January.2025

**Yayın tarihi / Publication date:**  
24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

B. Dönmez Gökboğa 0000-0003-1790-7621

Ş. Öksüz 0000-0002-4893-5564

E. Çalışkan 0000-0002-9451-7865

C. E. Öztürk 0000-0002-4330-2864

N. Ege 0000-0001-6980-9244

E. Acar 0000-0003-0461-335X

B. H. Keskin 0000-0002-2102-3952

✉ drbetuldonmez@gmail.com

## GİRİŞ

Koronavirüsler (CoV), insanlarda enfeksiyonlarına neden olabilen zoonotik viral patojenlerdir. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) 7 Ocak 2020'de insanlarda enfeksiyona neden olan yeni bir koronavirüs ortaya koymuştur. Bu virüs, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi tarafından SARS-CoV-2 olarak adlandırılmış, virüsün neden olduğu hastalık ise coronavirus disease-2019 (COVID-19) olarak tanımlanmıştır<sup>(1)</sup>.

SARS-CoV-2, 80-120 nm çaplı, zarflı, pozitif polariteli, helikal simetrideli, tek sarmallı, segmentsiz bir RNA virusudur<sup>(2)</sup>. SARS-CoV-2 virüsü alt solunum yollarını enfekte eder ve insanlarda pnömoniye neden olur. Hastalık ilerledikçe solunum fonksiyon bozukluğu ve ölümcül bir hiperinflamasyon meydana gelebilir<sup>(3)</sup>. COVID-19'un mikrobiyolojik tanı yöntemleri; serolojik testler, nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, CRISPR (Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrarlar) temelli tanı yöntemleri ve hücre kültürüdür<sup>(4)</sup>. COVID-19'dan maske kullanımı, el antiseptisi gibi genel hijyen kurallarına uyararak ve aşılanarak korunmak mümkün olabilmektedir. Aşıların oluşturduğu hücresel ve humoral cevabı, aşının türü, yaş, cinsiyet, ek hastalık varlığı gibi birçok kişisel faktör etkileyebilmektedir<sup>(5)</sup>.

Bu çalışmanın hedefi, CoronaVac® ve BioNTech® aşı uygulamalarından sonra meydana gelen, hücresel ve humoral yanıtın göstergeleri olan interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ile immünooglobülin G (IgG) antikor seviyelerinin çeşitli demografik verilerle birlikte karşılaştırılmasıdır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Düzce Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu tarafından (20.09.2021 tarih ve 2021/195 sayı) onaylanmıştır. Araştırma katılan gönüllülere demografik ve epidemiyolojik veriler içeren anket formu yüz yüze uygulanmıştır.

Çalışmamıza Ekim 2021-Aralık 2021 tarihleri arasında, COVID-19 hastalığı geçirmemiş, CoronaVac® ve Pfizer/BioNTech® aşılarını ikişer doz olarak yaptırmış, ikinci doz üzerinden en fazla 1-4 hafta süre geçmiş, 40-60 yaş aralığındaki 40 gönüllü katıldı. CoronaVac® aşısı uygulanmış 18 gönüllü ve BioNTech® aşısı uygulanmış 22 gönüllünün serumlarından Anti-SARS-CoV-2 Interferon Gamma Release Assay (IGRA-Euroimmun, Türkiye) testi ile IFN- $\gamma$ , SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit (Abbott Diagnostics, İrlanda) ile SARS-CoV-2 IgG antikor yanıtı araştırıldı. Anti-SARS-CoV-2 IGRA testi üretici talimatları doğrultusunda çalışıldı ve yorumlandı. Sonuçları yorumlarken IFN- $\gamma$  düzeyi; <100 mIU/ml "negatif SARS-CoV-2", 100-200 mIU/ml "borderline", >200 mIU/ml "pozitif" SARS-CoV-2" olarak değerlendirildi.

SARS-CoV-2 IgG antikor yanıtı da yine üretici talimatları doğrultusunda Abbott-Architect i2000SR cihazı ile çalışıldı. Sonuçlarının değerlendirilmesinde; <50.0 AU/MI negatif,  $\geq$ 50.0 AU/MI pozitif olarak kabul edildi.

## İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki tüm verilerin türüne göre uygun tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, medyan, çeyrekler arası genişlik, yüzde) hesaplandı. Sürekli nicel değişkenlerin normallik varsayım kontrolü "Shapiro-Wilk" testiyle, grup varyanslarının homojenliği ise "Levene" testiyle incelendi. Sürekli nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmasında "Kruskal Wallis" (post hoc "Dunn" testi), "Independent samples t" ve "Mann-Whitney U" testleri uygulanırken, farklı kategorik değişkenlerin de etkisini birlikte incelemek için nonparametrik "two-way ANOVA" (post hoc "Hochberg" test) uygulandı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler "Pearson Chi-Square", "Fisher Freeman Halton" (post hoc "Bonferroni" test) ve "Fisher Exact" testleriyle incelendi. Nicel değişkenler arasındaki ilişkiler "Spearman" korelasyon analiziyle değerlendirildi.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## BULGULAR

Çalışmaya katılan gönüllülerin %47.5'i kadın %52.5'i erkek ve medyan yaşı 56 idi. Gönüllüler CoronaVac® ya da BioNTech® aşılarını olma durumlarına göre iki gruba ayrıldı. Çalışmaya alınan gönüllüler epidemiyolojik olarak yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi (VKİ), supplement kullanımı (gıda takviyesi) ve diyabetes mellitus, hipertansiyon, tiroid bozuklukları, astım, aterosklerotik kalp hastalığı, otoimmün hastalık, allerji, immüsupresyon gibi epidemiyolojik-demografik özellikler uygulanan anket formu ile sorgulandı. Supplement sorgulamasından kasıt D, C ve B12 vitaminleri ile omega-3 gibi mikrobelerin kullanımıdır. İncelenen her iki grup da yaş, cinsiyet, VKİ, supplement kullanımı açısından homojendi.

Ancak ek hastalıkların sayısı açısından aşı grupları arasında anlamlı bir fark vardı ( $p=0.001$ ) (Tablo 1). Her iki aşı grubundaki immün yanıtlar kantitatif olarak değerlendirildiğinde ise, IFN- $\gamma$  ve IgG antikor yanıtı BioNTech® aşı grubunda, CoronaVac® aşı grubunda tespit edilen sonuçlardan anlamlı seviyede daha yüksek saptandı ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ).

IgG antikor yanıtı incelendiğinde sadece bir gönüllüde IgG antikor yanıtı negatif olarak bulunurken, diğer gönüllülerde pozitif olarak saptandı. Negatif saptanan bu gönüllünün CoronaVac® aşısı olduğu, DM, HT ve kanser hastalıkları varlığı saptandı. IFN- $\gamma$  cevabı incelendiğinde ise CoronaVac® aşısı olan dört gönüllüde IFN- $\gamma$  cevabı negatif, yine CoronaVac® aşısı olan dört ve BioNTech® aşısı olan bir gönüllü olmak

**Tablo 1. CoronaVac ve BioNTech aşı grubundakilerin epidemiyolojik özellikleri**

Özellik		CoronaVac aşı grubu		BioNTech aşı grubu		Toplam		p
		n	%	n	%	n	%	
Cinsiyet	Kadın	11	61.1	8	36.4	19	47.5	0.119
	Erkek	7	38.9	14	63.6	21	52.5	
Yaş*		56.5 [4.5]		56 [12.3]		56 [18]		0.160
VKİ		30.9±6.2		27.7±2.9		29.1±4.8		0.056
Ek hastalık varlığı	Yok	6	33.3	14	63.6	20	50.0	0.057
	Var	12	66.7	8	36.4	20	50.0	
Ek hastalık sayısı	Yok	6	33.3	14	63.6	20	50.0	<b>0.001</b>
	Bir	3	16.7	8	36.4	11	27.5	
	Birden çok	9	50.0	0	0.0	9	22.5	
Suplement kullanımı	Evet	2	11.1	2	9.1	4	10.0	0.999
	Hayır	16	88.9	20	90.9	36	90.0	

\*Medyan [Çeyrekler arası genişlik]

**Tablo 2. CoronaVac ve BioNTech aşıları sonrası oluşan IFN- $\gamma$  ve IgG antikor yanıtlarının karşılaştırılması**

İmmün yanıt tipi		CoronaVac		BioNTech		Toplam		p
		n	%	n	%	n	%	
IFN- $\gamma$	Pozitif	10	55.6	21	95.5	31	77.5	<b>0.007</b>
	Negatif	4	22.2	0	0.0	4	10.0	
	Borderline	4	22.2	1	4.5	5	12.5	
IgG antikor	Pozitif	17	94.4	22	100.0	39	97.5	0.450
	Negatif	1	5.6	0	0.0	1	2.5	

üzere toplamda beş gönüllüde borderline, kalan 31 gönüllüde ise pozitif olarak saptandı. IFN- $\gamma$  cevabı negatif olan gönüllülerde DM, HT, kanser, tiroid bozuklukları gibi hastalıklar mevcuttu, bir hastaya böbrek nakli yapılmıştı. Araştırmaya dahil edilen aşı grupları arasında IgG antikor yanıtı açısından anlamlı bir fark saptanmazken, IFN- $\gamma$  cevabı açısından anlamlı düzeyde fark saptandı ( $p=0.007$ ), ( $p>0.05$ ) (Tablo 2).

Çalışmaya katılan gönüllülerin epidemiyolojik verileri kantitatif olarak incelendiğinde, cinsiyet, yaş grubu, VKİ, ek rahatsızlık mevcudiyeti ve adedi ile supplement alımına göre IFN- $\gamma$  cevabı düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). IgG antikor düzeyleri açısından incelendiğinde ise ek rahatsızlık adedi haricinde kalan diğer veriler arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Buna göre IgG antikor değeri, birden fazla ek hastalığı olanlarda, bir adet ek hastalığı olan ve ek hastalığı olmayanlara göre anlamlı düzeyde daha düşük saptandı ( $p=0.030$ ).

CoronaVac® aşı grubunda ek rahatsızlığı olan ve olmayan gönüllülerin IFN- $\gamma$  ve IgG seviyeleri, BioNTech® aşı grubunda tespit edilen sonuçlardan anlamlı seviyede daha düşük saptandı ( $p=0.001$ ). IFN- $\gamma$  ve IgG antikor yanıtları kalitatif olarak değerlendirildiğinde ise aşı grupları arasında cinsiyet, yaş grubu, VKİ, supplement alımı, ek rahatsızlık mevcudiyeti ve adedine göre aralarında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.005$ ).

## TARTIŞMA

SARS-CoV-2, hâlâ tüm dünyayı tehdit eden ve çok hızlı yayılabilen bir virüsdür. SARS-CoV-2 virüs yayılımının etkin ve kalıcı şekilde kontrolünün sağlanması için aşı ile oluşturulacak bağışık yanıtı ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü aşılardan, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrol altına alınmasında en etkili ve ekonomik yol olduğu kanıtlanmıştır<sup>(6)</sup>. Çalışmamızda doğal ve edinsel bağışık yanıtı göstergesi olan IgG ve IFN- $\gamma$  yanıtlarının iki farklı aşı grubunda farklı düzeylerde olduğu gönüllüler üzerinde gösterilmiştir.

İleri yaş, solunum yolu viral enfeksiyonları sırasında hastalığın ciddiyeti için yaygın bir komorbiditedir. Literatürde yaşlılarda antikor yanıt oranı ve cinsiyet ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda da yaşlı popülasyonda yaşla birlikte antikor seviyesinde ve T hücre yanıtında düşüşler tespit edilmiştir<sup>(7,8)</sup>. Vural ve ark.'ları<sup>(9)</sup> sağlık çalışanlarında SARS-CoV-2 aşısı sonrası gelişen immünolojik yanıtları araştırmışlar ve 40 yaş altı gönüllülerde 40 yaş üstü gönüllülerden daha yüksek düzeyde antikor titresi saptamışlardır. Karamese ve ark.'nın<sup>(8)</sup> yapmış olduğu çalışmada, cinsiyet ile CoronaVac® aşısı sonrası ortalama antikor düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda ise BioNTech® ve CoronaVac® aşılardan oluşan IFN- $\gamma$  ve IgG antikor yanıtları, 40-60 yaş grubu ve cinsiyetler açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yukarıda bildirilen çalışmalardan farklı olarak araştırmamızda yaş grupları arasında anlamlı fark saptanmamış olması çalışmamıza katılan gönüllü örneklem sayısının az olmasına bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

Vücut kitle indeksi (VKİ)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> olarak tanımlanan fazlakilolu olmadurumu, COVID-19 hastalığının şiddeti için bir risk faktörü olarak gösterilmektedir<sup>(10)</sup>. Butsch ve ark.<sup>(11)</sup> yapmış olduğu çok merkezli araştırmada, FDA onaylı üç SARS-CoV-2 aşısının etkinliği, obezitesi olan ve olmayan iki grup arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Ranzani ve ark.<sup>(12)</sup> yapmış olduğu çalışmada, komorbiditenin daha düşük antikor yanıtına yol açabileceğini bildirmiştir. Karamese ve ark.<sup>(8)</sup> 65 yaş ve üzeri katılımcılarda CoronaVac® aşısının antikor yanıtı üzerindeki etkinliğini araştırdıkları çalışmasında, en az bir komorbid hastalığı olan katılımcıların ortalama antikor düzeyleri ile komorbid hastalığı olmayanlar arasında anlamlı bir fark saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise BioNTech® ve CoronaVac® aşılardan oluşan hem IFN- $\gamma$  cevabı hem de IgG yanıtı ile VKİ arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Diğer çalışmalarla araştırmamızdaki bu farklılığın nedeninin VKİ' şiddetinin oransal değişikliğine bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

Kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, obezite ve hiperglisemi gibi çeşitli kronik/metabolik hastalıklar şiddetli COVID-19'un hem hızlandırıcıları hem de sonuçlarından olduğu için COVID-19 aşılarının etkinliğini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle SARS-CoV-2 aşı yanıtı, komorbid hastalığı olan kişilerde dikkatle değerlendirilmelidir<sup>(13)</sup>. Geisen ve ark.<sup>(14)</sup> SARS-CoV-2 mRNA aşılarının immünojenitesi ve güvenliği ile ilgili yapmış olduğu çalışmada, iki doz aşı uygulamasından sonra kronik inflamatuvar hastalığı olan ve immünosupresif tedavi alan kişilerde daha düşük anti-SARS-CoV-2 antikor düzeylerini tespit etmişlerdir. Araştırmamızda komorbid hastalığı (VKİ, DM, HT, KVH, kanser, otoimmün hastalık vb.) olan gönüllüler ek hastalık varlığı/yokluğuna göre değerlendirilmiş, IFN- $\gamma$  ve IgG düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak ek hastalık sayısına göre değerlendirildiğinde ise birden çok ek hastalık sayısı olanlar ile tek ek hastalığı olanlar arasında IFN- $\gamma$  yanıtı açısından anlamlı bir fark bulunmazken; IgG antikor yanıtı açısından anlamlı fark bulunmuştur. Çalışmamızda, kanser hastalığı olan bir katılımcıda IgG ve IFN- $\gamma$  yanıtı ile böbrek nakli yapılan ve immünosupresif tedavi alan bir gönüllü de IFN- $\gamma$  negatif tespit edilmiştir.

Gıdalarla alınan B12, C, D, E, vitamini, çinko ve omega-3 yağ asitleri gibi mikrobeyinler antioksidan özellikleri ve immünomodülatör etkileri ile bilinmektedir. Son çalışmalarda, bu mikrobeyinlerin COVID-19 hastalarında destekleyici bir rol oynayabileceği, SARS-CoV-2 viral yükünü ve hastanede kalış süresini azaltabileceği de vurgulanmıştır<sup>(15)</sup>. Literatür taramamızda, influenza, difteri, tetanoz, hepatit B gibi hem bakteriyel hem viral aşılarla verilen immün yanıt ile supplement olarak alınan adı geçen mikrobeyinlerin kullanımı arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma tespit edilmiştir<sup>(16,17)</sup>. Ancak taramamızda, SARS-CoV-2 aşısına verilen immün yanıt ile mikrobeyin kullanımı arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunamamıştır. Çalışmamızda, gönüllülerin supplement olarak D, C, B12 vitaminleri ile omega-3 gibi mikrobeyinlerin kullanımı ile SARS-CoV-2 aşısı sonrası gelişen hücresel ve humoral yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu yönüyle araştırmamız orijinal olup, literatür tarama sonuçlarımıza göre ilk olma özelliği taşımaktadır.

Viral enfeksiyonlar sırasında IgM antikor ilk savunma hattını oluştururken, IgG antikorlarına bağlı immün yanıt uzun süreli ve yüksek afiniteli bağışıklık oluşturmaktadır<sup>(18,19)</sup>. Ülkemizde yapılan araştırmalardan Davarcı ve ark.<sup>(20)</sup> sağlık çalışanlarında CoronaVac® aşısı sonrası antikor cevabını araştırmışlar ve ikinci dozdan sonra aşı etkinliğini %94.6 olarak bulmuşlardır. Yalçın ve ark.'nın<sup>(21)</sup> Ankara'da 148 gönüllü üzerinde yapmış olduğu çalışmalarında, CoronaVac aşısının ilk dozundan sonra katılımcıların %35.2'sinde, ikinci dozdan sonra ise %100'ünde IgG antikor yanıt varlığını saptamışlardır. Binay ve ark.'nın<sup>(22)</sup> yapmış olduğu çalışmada iki doz CoronaVac® aşısından sonra SARS-CoV-2 IgG pozitiflik oranını %100 olarak bulmuşlardır. Araştırmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre, çalışmamıza katılan gönüllülerde CoronaVac® ve BioNTech® aşılarının antikor pozitiflik oranları sırasıyla %94.4 ve %100 olarak saptanmıştır. Yurt dışında yapılan araştırmalardan Hong Kong'da yapılan bir çalışmada, BioNTech® ve CoronaVac® aşılarının bağışıklık yanıtı karşılaştırılmış ve BioNTech® aşısı yapılan gönüllülerde CoronaVac® aşısı yapılanlardan daha fazla humoral yanıt varlığı tespit edilmiştir<sup>(23)</sup>. Şili'de Sauré ve ark.<sup>(24)</sup> yaptığı çalışmada, BioNTech® aşısı yapılan gönüllülerde CoronaVac® aşısı yapılanlardan daha fazla IgG seropozitifliği bulunmuştur. Bulgularımıza göre özellikle CoronaVac® aşısına bağlı oluşan antikor cevabı, literatürdeki diğer çalışmalardan nisbeten daha düşük saptanmıştır. BioNTech® aşısına bağlı oluşan antikor cevabının sonuçları ise literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Yukarıda bildirilen çalışmalarla araştırmamızdaki bu farklılığın nedeninin diğer çalışmalarda bazı farklı yöntemlerin [ELFA (Enzyme Linked Florentcent assay)<sup>(22)</sup>, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)<sup>(20)</sup>, virüs nötralizasyon testi<sup>(23)</sup>, plak redüksiyon nötralizasyonu<sup>(23)</sup>] kullanılması olabileceğini düşündürmüştür.

COVID-19 enfeksiyonunda hem aşı yanıtı hem de akut/geçirilmiş enfeksiyon tanısı amacıyla antikor saptama tetkikleri sıkça tercih edilmesine karşın, T hücre yanıtını tespit eden testler daha az sıklıkla kullanılmaktadır<sup>(25)</sup>. IFN- $\gamma$ , spesifik antijenlere karşı T hücresi aracılı immün yanıtı ölçmek için kullanılan anahtar bir sitokindir. Bu amaçla kullanılan SARS-CoV-2 IGRA testi, SARS-CoV-2'ye karşı humoral

antikor yanıtının saptanamadığı bazı durumlarda T hücreyi yanıtını tespit edebildiği için, aşı tarafından oluşturulan bağışıklık yanıt hakkında daha güvenilir bilgi vermektedir. Martínez-Gallo ve ark.<sup>(26)</sup> 20 sağlık çalışanı üzerinde yapmış olduğu bir araştırmada, SARS-CoV-2'nin N ve S proteinlerine yönelik antikor ve IFN-γ yanıtlarını araştırmışlar, IGRA testinin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %100 ile %86 olarak saptamışlardır. Huzly ve ark.<sup>(27)</sup> 127 gönüllü üzerinde yaptığı bir başka araştırmada ise, SARS-CoV-2 IGRA testinin özgüllüğü %96,3-100 ve duyarlılığı %75.4–86.9 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular COVID-19 aşısı sonrası, SARS-CoV-2'ye özgü T hücre yanıtını saptamak için anti-SARS-CoV-2 IGRA testinin pratik ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Ancak Anti-SARS-CoV-2 IGRA testinin güvenilirliğini belirlemek için daha geniş kapsamlı ve altın standart bir yöntemle karşılaştırmalı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Araştırmamızda mali yetersizlikten dolayı; gönüllü örneklem sayısının azlığı, yine ekonomik desteğin az olmasına bağlı olarak kullandığımız yöntemin altın standart yöntemlerle karşılaştırmasının yapılmamış olması ile uzun aralıklarla IgG antikor ve IFN-γ ölçümleri tekrarlanamamış olması, doğal ve edinsel bağışıklığı gösteren diğer parametrelerin bakılamaması çalışmamızın kısıtlıkları olarak kabul edilmiştir.

Sonuç olarak bu araştırma, BioNTech® ve CoronaVac® aşılı uygulanmış gönüllülerde hem IgG antikor hem de IFN-γ yanıtını değerlendiren bir ön çalışmadır. Araştırmamızda COVID-19 hastalığına karşı kullanılan BioNTech® ve CoronaVac® aşılılarına karşı oluşan IFN-γ yanıtı ile IgG antikor yanıtları arasında uyum saptanmıştır. SARS-CoV-2'ye karşı antikor yanıtının tespiti ile birlikte Anti-SARS-CoV-2 IGRA testleri COVID-19 hastalığına karşı bağışık yanıt durumunu ölçmek için önemli parametrelerdir. Bu testler çok sayıda numuneye tekrarlanabilir olarak uygulanabilir olması nedeniyle sağlık çalışanları gibi enfeksiyona yeniden maruz kalma riski altındaki hassas gruplar için COVID-19 aşılı yanıtının tespitinde değerli bir belirteç haline gelebilirler.

**Etik Kurul Onayı:** Bu araştırma, Düzce Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu tarafından (20.09.2021 tarih ve 2021/195 sayılı) onaylanmıştır.

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

**Finansman:** Bu çalışma Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2021.04.01.1187 protokol numarası ile desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** This research was conducted with the approval of Duzce University, Non-invasive Health Research Ethics Committee (09.20.2021; 2021/195).

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

**Funding:** This research was funded by Duzce University, Scientific Research Projects Coordination Unit (no: 2021.04.01.1187).

## KAYNAKLAR

1. Eryılmaz E, Keşli R. Sars koronavirus-2 (SARS-CoV-2) Virolojik özellikleri ve diğer koronaviruslardan farkı. Selçuk Sağlık Derg. 2020;1:1-9.
2. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. Microbiol Mol Biol Rev. 2005;69(4):635-64. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005>
3. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. COVID-19 (SARS-CoV-2 enfeksiyonu) rehberi. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü; 14 Nisan 2020.
4. Temel A, Ateş A, Eraç B. COVID-19 pandemisinde mikrobiyolojik tanı yöntemleri. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):99-108. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2021.47550>
5. Aslan İ. SARS-CoV-2'ye (Covid-19) karşı geliştirilen aşılılar. Elite Research and Surgical Hospital, Department of Genetics, 2021. [<https://www.elitenicosia.com/sars-cov-2ye-covid-19-karsi-gelistirilen-asilar/>] (Erişim tarihi: Mart 2024)
6. Mavi D, İnkaya AÇ. COVID-19: İmmün patogenezi. Flora. 2020;25(2):121-31. <https://doi.org/10.5578/flora.69606>
7. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. Nat Rev Immunol. 2020;20(9):529-36. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>

8. Karamese M, Tutuncu EE. The effectiveness of inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) on antibody response in participants aged 65 years and older. *J Med Virol.* 2022;94(1):173-7. <https://doi.org/10.1002/jmv.27289>
9. Vural S, Hacibekiroğlu M, Yıldız FR, Vural P. Pandemide COVID-19 geçirmiş ve geçirmemiş bir grup sağlık çalışanında aşı sonrası gelişen immünolojik cevap. *Ankem Derg.* 2021;35(2):45-52. <https://doi.org/10.5222/ankem.2021.045>
10. Campbell J, Sutherland J, Bucknall D, et al. Equity in vaccine trials for higher weight people? A rapid review of weight-related inclusion and exclusion criteria for COVID-19 clinical trials. *Vaccines.* 2021;9(12):1466. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121466>
11. Butsch WS, Hajduk A, Cardel MI, et al. COVID-19 vaccines are effective in people with obesity: A position statement from The Obesity Society. *Obesity.* 2021;29(10):1575-9. <https://doi.org/10.1002/oby.23251>
12. Ranzani OT, Hitchings MDT, Dorion M, et al. Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of COVID-19 in Brazil: Test negative case-control study. *BMJ.* 2021;20(374):2015. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2015>
13. Stefan N, Birkenfeld AL, Schulze MB. Global pandemics interconnected- obesity, impaired metabolic health and COVID-19. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17(3):135-49. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00462-1>
14. Geisen UM, Berner DK, Tran F, et al. Immunogenicity and safety of anti-SARS-CoV-2 mRNA vaccines in patients with chronic inflammatory conditions and immunosuppressive therapy in a monocentric cohort. *Ann Rheum Dis.* 2021;80(10):1306-11. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-220272>
15. Shakoor H, Feehan J, Al AS, et al. Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19? *Maturitas.* 2021;143(1):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.08.003>
16. Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, et al. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *JAMA.* 1997;277(17):1380-6. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03540410058031>
17. Lee MD, Lin CH, Lei WT, et al. Does vitamin D deficiency affect the immunogenic responses to influenza vaccination? A systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2018;10(4):409. <https://doi.org/10.3390/nu10040409>
18. Akdeniz N, Deniz G. Yeni Coronavirus (COVID-19) hastalığında immün yanıt. Çakmakçoğlu B, Ekmekçi SS, Küçüksezer UC, Yılmaz V, Deniz G, editörler, COVID-19: Moleküler ve klinik yaklaşım kitabında. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınevi; 2020:253-61. <https://doi.org/10.26650/BB/CH22.2020.008.26>
19. Jordan SC. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: Relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clin Exp Immunol.* 2021;204(3):310-20. <https://doi.org/10.1111/cei.13582>
20. Davarcı İ, Eryıldız C, Gürcan Ş. Sağlık çalışanlarında inaktive SARS-CoV-2 aşısı ile aşılama sonrası antikor yanıtının değerlendirilmesi. *Flora.* 2021;26(2):338-43. <https://doi.org/10.5578/flora.20219813>
21. Yalçın TY, Topçu D, Doğan Ö, et al. Immunogenicity after two doses of inactivated virus vaccine in healthcare workers with and without previous COVID-19 infection: Prospective observational study. *J Med Virol.* 2022;94(1):279-86. <https://doi.org/10.1002/jmv.27316>
22. Binay UD, Karakecili F, Barkay O, Gül O, Mertoğlu C. Level of SARS-CoV-2 IgG antibodies after two doses CoronaVac vaccine: Primarily report. *J Antivir Antiretrovir.* 2021;13(5):18. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-388073/v1>
23. Mok CKP, Cohen CA, Cheng SMS, et al. Comparison of the immunogenicity of BNT162b2 and CoronaVac COVID-19 vaccines in Hong Kong. *Respirology.* 2022;27(4):301-10. <https://doi.org/10.1111/resp.14191>
24. Sauré D, O’Ryan M, Torres JP, Zuniga M, Santelices E, Basso LJ. Dynamic IgG seropositivity after rollout of CoronaVac and BNT162b2 COVID-19 vaccines in Chile: A sentinel surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(1):56-63. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00479-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00479-5)
25. Hellerstein M. What are the roles of antibodies versus a durable, high quality T-cell response in protective immunity against SARS-CoV-2? *Vaccine X.* 2020;6(11):100076. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2020.100076>
26. Martínez-Gallo M, Esperalba J, Sandá V, et al. Commercialized kits to assess T-cell responses against SARS-CoV-2 S peptides. A pilot study in health care workers. *Med Clin (Barc).* 2022;159(3):116-23. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2021.09.013>
27. Huzly D, Panning M, Smely F, Enders M, Komp J. Accuracy and real life performance of a novel interferon-γ release assay for the detection of SARS-CoV-2 specific T cell response. *J Clin Virol.* 2022;148(3):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105098>

# Döner ve Salatalarda *Salmonella* spp. Araştırılması: Yanlış Pozitif Sonuçların Önemi

## Investigation of *Salmonella* spp. in Doner Kebab and Salads: Significance of False Positive Results

Perihan Akbaş\*, Çiğdem Sezer\*\*, Fatih Büyük\*\*\*, Gönül Damla Büyük\*\*, Eray Büyük\*\*\*

\* Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Samsun, Türkiye

\*\* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı Bölümü, Kars, Türkiye

\*\*\* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Mikrobiyoloji Bölümü, Kars, Türkiye

**Atf/Cite as:** Akbaş P, Sezer Ç, Büyük F, Büyük GD, Büyük E. Döner ve salatalarda *Salmonella* spp. araştırılması: Yanlış pozitif sonuçların önemi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):63-72.

### Öz

**Amaç:** *Salmonella*'lar Enterobacteriaceae ailesi içerisinde bulunan gram negatif bakterilerdir. Çiğ ve pişmiş gıda ürünlerinde *Salmonella* spp. bulunması risk oluşturmaktadır. Gıdada *Salmonella* tespit edilmesi bu etken sıcaklığa dayanıksız olduğundan kontaminasyonun ısı işleminden sonra olduğu veya ısı işlemin yetersiz olduğunun bir göstergesidir. Bu çalışmada Kars ilinde tüketime hazır dönerler, tüketime hazır salatalar ve marketlerde paketli satılan dönerlerde *Salmonella* spp. Varlığı araştırılmıştır.

**Yöntem:** Etken analizi konvansiyonel yöntemlerle (kültür ve takiben fenotipik analiz) ve *invA* geni ve *oriC* geni temelli moleküler yöntemlerle (PCR ve sekanslama) gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Konvansiyonel yöntemlerle analiz sonucu tüketime hazır dönerlerden beş adet, salatalardan üç adet ve paketli dönerlerden iki adet olmak üzere *Salmonella* spp. taşıdığı düşünülen toplam 10 adet izolat elde edilmiştir. Moleküler analizler sonucunda ise izolatlardan dördünün (%3.3) *Hafnia paralvei*, üçünün (%2.5) *Citrobacter portucalensis*, ikisinin (%1.6) *Citrobacter braakii* ve birinin (%0.8) *Hafnia alvei* olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Bu durum, insan tüketimine sunulmak üzere hazırlanan bu tür gıdaların *Salmonella* spp. açısından risk oluşturmadığını, ancak Enterobacteriaceae ailesinin patojenik olmayan türlerinden kaynaklanan kontaminasyonu göstermektedir. Örneklerde *Salmonella* spp. izole edilememiş olmasının gıda örneklerinin patojenler yönünden güvenli olduğunu göstermeyeceği, patojenlerin her zaman risk oluşturabileceği ve kontaminasyonun önlenmesi için hijyen ve sanitasyona dikkat edilmesi gerektiği unutulmamalıdır. Ortak birçok fenotipik özellikleri nedeniyle Enterobacteriaceae üyelerinin identifikasyonunda rastlanılabilecek yanlışmalar moleküler testlerin entegrasyonu ile giderilebilmektedir. Döner ve salata gibi ürünlerde kontaminasyonun önlenmesi ve halk sağlığı risklerinin en aza indirilmesi amacıyla üretim süreçlerinde sıkı hijyen kontrollerinin uygulanması önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Et Döner, *Salmonella*, Yanlış Pozitif

### ABSTRACT

**Objective:** *Salmonella* spp. are gram-negative bacteria in Enterobacteriaceae family. *Salmonella* spp. are harmful if they are found in food that is cooked or raw products.; since it is not thermally resistant, it indicates post-heat treatment contamination or inadequate heat treatment, as this pathogen is not thermally resistant. In this study, the presence of *Salmonella* spp. in ready-to-eat doner kebabs, salads and packaged doner kebabs sold in markets in Kars province was investigated.

**Methods:** The causative agents were analyzed by conventional methods (culture followed by phenotypic analysis) and molecular methods based on *invA* gene and *oriC* gene (PCR and Sanger sequencing).

**Results:** The examination using conventional methods yielded a total of 10 *Salmonella* spp.-suspect isolates: Five from ready-to-eat doner kebabs, three from salads, and two from packed doner kebabs. Molecular analyses revealed that four (3.3%) of the isolates were *Hafnia paralvei*, three (2.5%) were *Citrobacter portucalensis*, two (1.6%) were *Citrobacter braakii* and one was (0.8%) *Hafnia alvei*.

**Conclusion:** Findings indicate that these types of food prepared for human consumption does not has a risk in terms of *Salmonella* spp., but contamination from non-pathogenic species of the Enterobacteriaceae family. The lack of isolated *Salmonella* species in the samples does not ensure that the food is secure from infections; pathogens may still provide a risk, necessitating vigilance in hygiene and sanitation to avert infection. Due to many common phenotypic characteristics, errors in the identification of Enterobacteriaceae members can be eliminated by the integration of molecular tests. It is recommended to implement strict hygiene controls in production processes in order to prevent contamination and minimize public health risks in products such as doner kebab and salad.

**Keywords:** False Positive, Meat Doner, *Salmonella*

**Alındığı tarih / Received:**  
30.11.2024 / 30.November.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**  
21.01.2025 / 21.January.2025

**Yayın tarihi / Publication date:**  
24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

P. Akbaş 0000-0001-5977-7621  
Ç. Sezer 0000-0002-9722-3280  
F. Büyük 0000-0002-1588-756X  
G. D. Büyük 0000-0002-7310-6901  
E. Büyük 0000-0003-2071-8901

✉ perihan.akbas@omu.edu.tr

## GİRİŞ

Son yıllarda, günlük yaşamın yoğunlaşmasıyla birlikte, tüketicilerin yemek hazırlamaya ayırdıkları zaman azalmış ve bu nedenle hazır gıdalara olan talep artmıştır. Döner kebab, Türkiye’de ve dünyada önemli bir geleneksel fast food ürünü olarak öne çıkmaktadır. 2020 yılı verilerine göre Türkiye’de günlük döner tüketimi yaklaşık 900 ton olarak kaydedilmiştir<sup>(1)</sup>.

Döner üretiminde, kuzu, dana, ya da kanatlı eti biber, soğan, domates ve çeşitli baharatlarla tatlandırılır. Et ve hayvansal yağlar kıyılarak veya öğütülerek baharatlarla karıştırılır ve koni şeklinde kalıplanır. Bu kütle, et ve yağ parçalarının bir arada kalmasını sağlamak amacıyla soğutulur. Çiğ döner, dikey bir şiş üzerine sabitlenerek elektrikli, gazlı veya odun kömürü ile pişirme sağlayan bir ısıtma elemanının önünde yavaşça döndürülerek kızartılır ve ince ince kesilerek sunulur. Döner dilimleri, restoranlarda tabakta ya da sandviç şeklinde ekmeğin arasında (fast food ünitelerinde) çeşitli otlar, salatalar veya soslarla sunulmaktadır<sup>(2,3)</sup>. Bu ürünlerin mikrobiyolojik kalitesi; kullanılan hammaddenin kalitesi, pişirme sürecinin etkinliği, döner yapım tesisinin hijyen durumu ve personelin kişisel hijyenine bağlıdır. Döner gibi fast food ürünlerinin dünya genelinde popüler olması nedeniyle, çeşitli araştırmacılar bu ürünlerin hijyenik ve kimyasal kalitesini incelemişlerdir<sup>(4-6)</sup>.

Piştirilmiş gıdaların güvenliği, hem ısıtma işlem uygulaması hem de pişirme sonrasında gıdanın koruma yöntemlerine bağlıdır. Isıtma işlem sonrası canlılığı devam eden veya daha sonra bulaşan mikroorganizmalar, müsait ortam sağlandığında çoğalma gösterebilir. Döner ve benzeri gıdaları tüketen bireylerde, gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve zehirlenmeler ciddi sağlık sorunlarına dönüşebilir. Gıda zehirlenmeleri yalnızca bireylerin sağlığını tehdit etmez, iş gücü kaybı, tedavi masrafları, üretim düşüşü ve hatta ölüme kadar varabilecek sonuçlara sebep olabilir<sup>(7)</sup>.

*Salmonella* kaynaklı gıda enfeksiyonlarında yabani hayvanlar, yem ve çiftlik hayvanları önemli bir rol

oynar. Hayvansal gıdaların uygun olmayan koşullarda üretilmesi bu süreçte kritik bir yer tutmaktadır. Gıda kaynaklı enfeksiyonlarda *Salmonella*’nın oldukça yaygın olarak görülmesinin temel nedenlerinden biri, bakterinin zoonotik özellik göstermesi, çevresel faktörlere direnç gösterebilmesi ve çeşitli gıda türlerinde uzun vadede yaşamını sürdürebilme yeteneğidir. Özellikle antibiyotiklere karşı geliştirdiği çoklu direnç, *Salmonella*’nın halk sağlığı açısından küresel önemini artırmaktadır. *Salmonella* enfeksiyonlarının yaygın bulaşma yolları arasında, hayvanlardan doğrudan bulaşma dışında, çapraz kontaminasyon önemli bir rol oynamaktadır<sup>(8)</sup>. *Salmonella*’nın çapraz kontaminasyonu, bu patojenin çiğ tavuk gibi kontamine kaynaklardan diğer gıda maddelerine veya yüzeylere aktarılması ve böylece gıda kaynaklı hastalıklara yol açması anlamına gelir. Araştırmalar, tavuk mezbahalarının *Salmonella* çapraz kontaminasyonu için önemli alanlar olduğunu ve ilgili yüzeylere göre değişen transfer oranları bulunduğunu göstermektedir<sup>(9)</sup>. Ayrıca, döner kebablarında *Salmonella*’nın çapraz kontaminasyonu, birçok çalışmanın kanıtlandığı gibi ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Ayrıca, kontamine tavuk eti içeren kebab eti ile bağlantılı çok ülkeli bir salgın bildirilmiştir ve birkaç Avrupa ülkesinde vakalar, kebab etinin *Salmonella* enfeksiyonları için potansiyel bir araç olduğunu göstermektedir<sup>(10,11)</sup>. Bu bulgular, tavuk etlerinde *Salmonella* çapraz kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla döner kebablarının hazırlanmasında ve işlenmesinde ciddi gıda güvenliği önlemlerinin uygulanmasının gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

Kırmızı et, kesim sırasında hayvanların ayakları, kılları ve deri yüzeyinde bulunan fekal materyal ya da bağırsak içeriği ile *Salmonella* spp. bakterisi ile kontamine olabilir. Kontamine karkaslar, hammaddenin işlenmesi sırasında personelin elleri, kullanılan araçlar ve ekipmanlar aracılığıyla diğer karkasları da kontamine edebilir<sup>(12)</sup>. Kontamine karkaslar dışında döner yapımında kullanılan süt ürünleri (yoğurt, süt), baharatlar ve soğan gibi çiğ sebzeler de mikrobiyal yükü artırmaktadır<sup>(10)</sup>. Kırmızı etten yapılmış birçok gıdanın *Salmonella* içerebildiği üzerine yapılan çalışmalar kontaminasyonun ne denle önemli olduğunu vurgulamaktadır. Spesifik olmayan seçici besiyerlerinin kullanımı, *Salmonella*’yı

diğer bakterilerden net bir şekilde ayırt edememesi nedeniyle önemli bir problem oluşturmaktadır. Geniş bir gram negatif patojen grubunu hedef alan bu tür besiyerleri, *Salmonella*'ya benzeyen koloniler oluşturan *Salmonella* dışı bakterilerin üremesine olanak tanıyabilir<sup>(13)</sup>. Analiz yöntemlerindeki ilerlemeler dikkate alındığında, PCR ve gelişmiş seçici besiyeri tasarımı gibi teknikler, özgüllüğü artırmaya ve yanlış pozitif sonuçları azaltmaya yardımcı olabilir. Bu yenilikler, gelecekteki araştırmalar ve uygulamalar için umut vadeden bir alan sunmaktadır<sup>(14)</sup>.

Et ürünlerinde, özellikle döner gibi gıdalarda, standart test yöntemleri sırasında *Salmonella*'ya özellikleri yönünden benzer bakterilerin varlığı sonuçların yanlış pozitif olarak değerlendirilmesine neden olabilir. Bu durum, gereksiz ürün geri çağırımları ve ekonomik kayıplar açısından ciddi bir sorundur. *Citrobacter braakii* gibi mevcut mikrobiyota varlığı, geleneksel kültür yöntemleri ve biyokimyasal testlerde yanlış pozitif tanımlamalara neden olabilir<sup>(15)</sup>.

Bu çalışmada, kırmızı et üretimi ve döner kebab tüketimi alışkanlığının yaygın olduğu Kars yöresinde, et dönerler, yanlarında satışa sunulan salatalar ve paketli dönerler içerisinde bulunması muhtemel *Salmonella* etkeninin tür olarak teşhis edilmesi, analizler sonucunda elde edilen verilerin doğruluğunun araştırılması ve bu gıdaların halk sağlığı açısından değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Çalışma araçları:** Çalışmanın materyalini, Kars ilindeki farklı restoranlardan tüketime hazır olarak sunulan 40 adet et döner ve yanlarında servis edilmek üzere hazırlanmış 40 adet salata örneği, ayrıca marketlerde satılan 40 adet tüketime hazır-ısıtma işlem görmüş paketli et döner örneği olmak üzere toplam 120 adet örnek oluşturmuştur. Porsiyon şeklinde 100 gram alınan tüketime hazır et döner ve salata örnekleri, 2022 yılının Ocak ve Şubat aylarında toplanmış ve soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. Aynı dönem, marketlerden toplanan paketli döner ürünlerinin ise 200–250 gramlık olanları tercih edilmiştir.

***Salmonella* Etkenlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması:** Örnekler, Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı (Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi) laboratuvarlarında analiz edilmiştir. Örneklerden *Salmonella* spp. izolasyonu, "Food Emergency Response Network" (FERN) ve "Food and Drug Administration" (FDA) bakteriyolojik Analiz El Rehberi (BAM) protokollerine göre gerçekleştirilmiştir<sup>(16)</sup>.

**Ön zenginleştirme:** 225 ml Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) (Biolife-4012782-Milano, İtalya) ile örneklerden 25 gram alınarak, aseptik koşullarda Stomacher (Interscience FR-bagMixer 400, Fransa) cihazında homojenize edilmiştir. TPS içinde bulunan örnekler, 35°C'de 24±2 saat inkübe edilerek ön zenginleştirme yapılmıştır.

**Seçici zenginleştirme:** 10 ml "Rappaport Vassiliadis" (RVS), (Biokar-BK148HA-Fransa) broth içeren tüplere, TPS'de ön zenginleştirilmesi yapılan numunelerden 0.1 ml alınarak inoküle edilmiştir. RVS broth, 42±0.2°C'de 24±2 saat inkübe edilerek seçici zenginleştirme gerçekleştirilmiştir<sup>(17)</sup>. Aynı zamanda, TPS'de ön zenginleştirilmiş numuneden 1 ml alınarak, 10 ml "Tetrathionate" (TT) broth (Condolab-1114.00-Madrid, İspanya) besiyerine inoküle edilmiş ve 43±0.2°C'de 24±2 saat inkübe edilmiştir.

**Katı besiyerine ekim ve tanımlama:** İnkübasyon süresinin ardından, zenginleştirme kültüründen 10 µl alınarak, "Ksiloz-Lizin-Desoksikolat" (XLD) Agar (Neogen-UK305832/246-Birleşik Krallık), "Bismuth Sulfite" (BS) Agar (Condolab-CAT.1011.00-Madrid, İspanya) ve "Brilliant Green Agar" (BGA)'a, (Sigmaaldrich-VM985854 142-Almanya) ekim yapılmış ve petriyerler 35°C'de 24±2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, BS agar besiyerinde siyah bir zonla çevrili siyah koloniler, XLD agarda merkezleri siyah ve etrafı pembe olan koloniler, BGA'da ise parlak kırmızı bir zonla çevrili pembe-kırmızı koloniler tipik *Salmonella* spp. kolonisi olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerlerinde üreyen tipik kolonilerden en az beş tane, tipik koloni olmayan besiyerlerinden ise atipik kolonilerden beşer adet alınarak selektif agarlara ekim yapılmış ve saflık kontrolüne gidilmiştir. Saf olduğu tespit edilen izolatlar yatık agara ekilerek



uygun şartlarda inkübe edilip üretildikten sonra stok kültür olarak identifikasyon testlerinde kullanılmıştır.

*Salmonella* spp. şüpheli izolatların ön tanımlanması, "Triple Sugar Iron" (TSI) agarda (Neogen-NCM0144A-Birleşik Krallık) üreme karakteristikleri, üreaz aktivitesi gibi testlerle gerçekleştirilmiştir.

### Salmonella izolatlarının konvansiyonel PCR ile doğrulanması

**invA geni doğrulaması:** Örneklerden izole edilen ve *Salmonella* spp. olarak ön tanısı konulan izolatların doğrulaması için, *Salmonella* cinsine özgü olan *invA* geninin amplifikasyonunu sağlayan PCR yöntemi kullanılmıştır<sup>(18)</sup>. BHI agarda (Condolab-610021-Madrid, İspanya) taze kültürleri hazırlanan izolatlardan DNA ekstraksiyonu, SCLB buffer (Thermo Fisher Scientific-FNN0021-İsviçre) yardımıyla ısı işlem uygulanarak gerçekleştirilmiştir<sup>(19)</sup>. *invA* gen bölgesi, 244 bp uzunluğunda olup F: 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA-3' ve R: 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3' primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR termal döngü şartları Tablo 1'de verilmiştir.

**oriC geni doğrulaması:** *Salmonella* spp. olarak ön tanısı konulan izolatların doğrulaması için *oriC* geninin amplifikasyonu, Widjoatmodjo ve ark.<sup>(20)</sup> ile Fluit ve ark.<sup>(21)</sup> tarafından bildirilen PCR protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *oriC* geni için primerler, F: 5'-TTATTAGGATCGCGCCAGGC-3' ve R: 5'-AAAGAATACCTTGTGTGTCAC-3' olup, hedef gen bölgesi 163 bp uzunluğundadır. *oriC* geni PCR termal döngü şartları Tablo 2'de gösterilmiştir.

PCR sürecinde, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR ürünlerinin analizi %1.5 agaroz jelde ve görüntülenmesi UV transilluminatörde (UVP/LMS-20E) gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 1. invA geni için PCR termal döngü şartları**

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	1 dk	} 35
Bağlanma	53°C	1 dk	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	1

**Tablo 2. oriC geni için PCR termal döngü şartları**

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyonu	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	1 dk	} 35
Bağlanma	58°C	1 dk	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	1

**Sekans analizi:** İzolatlardan DNA ekstraksiyonu, nutrient agarda saf olarak elde edilen kolonilerden Genomik DNA Pürifikasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin sekansı amacıyla öncelikli olarak bu gen bölgesinin 27F (5'AGAGTTGATCCTGGCTCAG 3') ve 1492R (5' TACCTGTGACTT 3') primerleri ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu, 94°C'de 4 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 60°C'de 45 sn primer bağlanması, 72°C'de 1 dk uzama (35 döngü) ve 72°C'de 5 dk son uzama aşaması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizi 27F ve 1492R primerleri eşliğinde Hydra Biyoteknoloji şirketi tarafından gerçekleştirilmiştir.

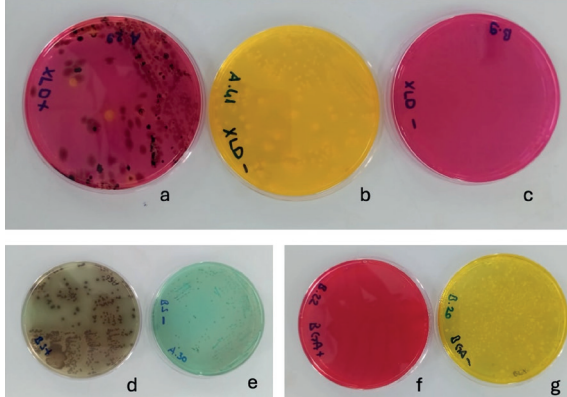
**Veri Analizi:** 16S rRNA tür tayini için Hydra Biyoteknoloji şirketi tarafından dizileme sonucu elde edilen veriler düzenlenip, tür tayini için NCBI nükleotid veri tabanı kullanılarak BLAST analizi yapılmıştır.

**İstatistik Analizler:** Örneklem büyüklüğü hesaplanmasında istatistiksel bir yazılım olan G\*Power sürüm 3.1 kullanılmıştır. Bu analizler esnasında; anlamlılık düzeyini ( $\alpha$ ) = 0,05, güç ( $1-\beta$  ( $\beta$  hata olasılığıdır)) = 0,8, etki büyüklüğü ( $f$ ) = 0,25, grup (yani ilçe) sayısı  $k = 3$  ve serbestlik derecesi ( $d$ ) = 2 olarak alınmıştır. Aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$N (\text{örneklem büyüklüğü}) = (\beta + (1 + \alpha))^2 \cdot (1 + d/k) / f^2$$

Formül uygulandığında örneklem büyüklüğü 158 olarak hesaplanmıştır, ancak çalışmada Kars ilindeki et döner satılan lokantaların miktarı dikkate alındığında 120 örnek analiz edilebilmiştir.

Et döner, salata ve paketli döner örneklerinde görülen kontaminasyon oranlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi, SPSS 20.0 istatistik programı ile yapılmıştır.



Şekil 1. XLD agar (a, b, c), BS agar (d, e) ve BGA agarda (f, g) 24 saatlik inkübasyon sonucu görüntü.

## BULGULAR

**İzolasyon ve identifikasyon sonuçları:** Kültürel analiz esnasında, XLD agarda merkezi siyah ve çevresi pembe koloniler (Şekil 1a), BS agarda siyah zonla çevrili siyah koloniler (Şekil 1d), BGA agarda ise parlak kırmızı zonla çevrili pembe-kırmızı koloniler (Şekil 1f) *Salmonella* spp. açısından şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, paketli döner örneklerinin 13 (%32,5)'ü, tüketime hazır et döner örneklerinin 17 (%37,5)'si ve salata örneklerinin 22 (%55)'si olmak üzere toplam 120 adet gıda örneğinin 52 (%43) adedinden kültür pozitifliği elde edilmiştir ve identifikasyon aşamasına geçilmiştir (Tablo 3). En yaygın kültür pozitifliği salata örneklerinde elde edilmiş olmasına rağmen, kültür pozitifliği ile örnek türleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p < 0,05$ ).

BGA, XLD ve BS agarda *Salmonella* spp. açısından şüpheli olarak değerlendirilen koloniler, TSI agardaki üreme özellikleri ve negatif üreaz aktivitesi ile *Salmonella* spp. olarak değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında 40 paketli döner, 40 salata ve 40 tüketime hazır döner örneğinden toplam 10 adet *Salmonella* spp. şüpheli izolat elde edilmiştir. Bu izolatların beşi (%12.5) tüketime hazır dönerlerden, üçü (%7.5) salatalardan ve ikisi (%5) paketli dönerlerden elde edilmiştir (Tablo 3). *Salmonella* spp. pozitifliği ile örnek türleri arasında anlamlı istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ( $p > 0,05$ ). *Salmonella* spp. şüpheli izolatların hangi örnekten tespit edildiği önemli değildir, tüm örneklerde geleneksel yöntemlerde *Salmonella* spp. şüpheli izolat bulunma ihtimali

Tablo 3. Kültürel ve moleküler yöntemlerle *Salmonella* spp. şüpheli olduğu değerlendirilen örnek sayısı (%)

Örnek	Örnek Sayısı (n)	Analiz edilen İzolat sayısı (Kültür pozitifliği)*	<i>Salmonella</i> spp. Şüpheli İzolat Sayısı <sup>†</sup>	Şüpheli İzolat Oranı (%)	PCR sonucunda <i>Salmonella</i> spp. olduğu doğrulanan örnek sayısı
Paketli Et Döner	40	13.00±2.64 <sup>b</sup>	2.00±1.00 <sup>e</sup>	5	0 <sup>f</sup>
Lokantada Satılan Et Döner	40	16.66±4.04 <sup>b</sup>	5.33±1.52 <sup>c</sup>	12.5	0 <sup>f</sup>
Salata	40	22.33±3.05 <sup>a</sup>	2.66±1.15 <sup>cd</sup>	7.5	0 <sup>f</sup>

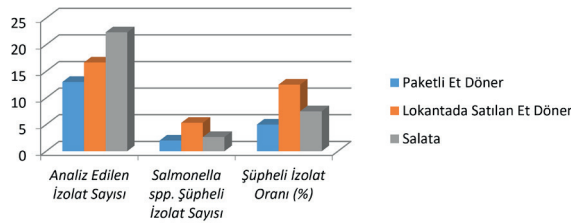
Aynı satır ve sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar  $p < 0,05$  düzeyinde farklıdır, veriler ortalama  $\pm$  SD olarak sunulmuştur.

\*<sup>a-f</sup>: Kültür pozitifliği ve *Salmonella* spp. şüpheli izolat pozitifliği ile örnek türleri arasındaki istatistiksel değerlendirmeyi ifade etmektedir.

eşittir. Tablo 3'den anlaşıldığı üzere salata ve lokantalarda satılan et döner örneklerinden elde edilen *Salmonella* spp. şüpheli izolat oranları birbirine yakın olmakla birlikte tüm sonuçlar istatistiki açıdan  $p < 0.05$  oranında farklıdır. PCR sonucunda *Salmonella* spp. olduğu doğrulanan örnek sayısı tüm örneklem gruplarında sıfırdır, istatistiki açıdan değerlendirildiğinde elde edilen bu sonuçlar  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlılık ifade etmektedir. Bu bakteri türünün tüketime hazır gıdalarda bulunması halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Kültürel yöntemlerle paketli et döner, lokantalarda satılan et döner ve salata örneklerinden elde edilerek analiz edilen izolat sayısı, *Salmonella* spp. şüpheli izolat sayısı ve şüpheli izolat oranı Şekil 2'de gösterilmektedir.

Şekil 2'den de görüldüğü gibi *Salmonella* spp. şüpheli izolat en çok salatalardan (22 adet) elde



Şekil 2. Paketli et döner, lokantalarda satılan et döner ve salata örneklerinden elde edilerek analiz edilen izolat sayısı, *Salmonella* spp. şüpheli izolat sayısı ve şüpheli izolat oranı

edilmiştir, sonrasında 16 adet lokantalarda satılan et dönerlerden elde edilirken, en az izolat ise paketli dönerlerden (13 adet) elde edilmiştir. Yapılan doğrulama testleri sonucunda ise iki adet paketli et dönerlerden, beş adet lokantalarda satılan et dönerlerden ve üç adet salata örneklerinden olmak üzere toplam 10 adet (%8.3) *Salmonella* spp. şüpheli örnek izole edilmiştir.

**Salmonella izolatlarının konvansiyonel PCR ile doğrulanma sonuçları:** *Salmonella* spp. şüpheli izolatlarının identifikasyonu amacıyla kullanılan *invA* ve *oriC* gen spesifik PCR analizleri sonucu tüm izolatlar *Salmonella* spp. yönünden negatif saptanmıştır (data sunulmamıştır).

**Sekans analizi sonuçları:** Sekans analizi sonucunda, izole edilen bakterilerin *Salmonella* spp. olmadığı teyit edilmiştir. Çalışmada kullanılan 120 örnekten; beşi tüketime hazır dönerlerden, üçü salatalardan ve ikisi paketli dönerlerden olmak üzere toplamda 10 izolat üzerinde yapılan dizileme sonuçları Tablo 4'de sunulmuştur.

Bu sonuçlar, elde edilen izolatların dördünün *Hafnia paralvei*, üçünün *Citrobacter portucalensis*, ikisinin *Citrobacter braakii*, ve birinin *Hafnia alvei* olduğunu ortaya koymuştur. İzolatların, *Enterobacteriaceae* familyasının birer üyesi olan *Hafnia* ve *Citrobacter* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4. Sanger dizileme sonuçları

Sıra No	Tespit Edildiği örnek	Bakterinin ismi	Eşleşme Numarası
1	Tüketime Hazır Döner	<i>Hafnia paralvei</i>	NZ_CP083737.1
2	Tüketime Hazır Döner	<i>Hafnia paralvei</i>	NZ_CP083737.1
3	Tüketime Hazır Döner	<i>Citrobacter portucalensis</i>	NZ_CP044098.1
4	Tüketime Hazır Döner	<i>Citrobacter portucalensis</i>	NZ_CP044098.1
5	Tüketime Hazır Döner	<i>Citrobacter braakii</i>	NZ_CP045771.1
6	Salata	<i>Hafnia alvei</i>	NZ_CP050150.1
7	Salata	<i>Hafnia paralvei</i>	NZ_CP083737.1
8	Salata	<i>Hafnia paralvei</i>	NZ_CP083737.1
9	Paketli Döner	<i>Citrobacter portucalensis</i>	NZ_CP044098.1
10	Paketli Döner	<i>Citrobacter braakii</i>	NZ_CP045771.1

## TARTIŞMA

Et ve süt ürünlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri genellikle *Hafnia*, *Yersinia*, *Citrobacter* ve *Edwardsiella* cinslerine ait bakterilerdir<sup>(22)</sup>. *Citrobacter* cinsi bakteriler, fakültatif anaerop ve hareketli gram-negatif basiller olup, daha çok *Citrobacter diversus* ve *C. freundii* türleri hastalıklara yol açmaktadır<sup>(23)</sup>. Bu bakteriler, süt ve süt ürünleri, çiğ deniz ürünleri ve taze sebzeler gibi gıdalarda bulunabildiği gibi, toprak, su ve atık su gibi çevresel ortamlarda da yaygındır. *Hafnia* ise genellikle memelilerin, kuşların, sürüngenlerin, balıkların ve böceklerin gastrointestinal sisteminden ve et ile süt ürünleri gibi gıdalardan izole edilmektedir<sup>(24,25)</sup>. *Hafnia* ve *Serratia* türleri *Enterobacteriaceae* üyesidir ve her zaman bağırsak kaynaklı kirlenme göstergesi değildirler<sup>(26)</sup>.

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, tavuk döner örneklerinin %15.3’ünün *Salmonella* spp., özellikle *Salmonella* Infantis ile kontamine olduğu tespit edilmiştir ve bu durum, bu ürünlerden kaynaklanan gıda kaynaklı enfeksiyon potansiyelini ortaya koymaktadır<sup>(10)</sup>. Ülkemizde yapılan araştırmalar, Samsun ilinde dana köfte ve kıyma örneklerinden %20 oranında *Salmonella* spp. izole edildiğini ortaya koymuştur<sup>(27)</sup>. Benzer şekilde, Hampikyan ve ark.<sup>(28)</sup> izgara et, köfte, döner ve kokoreç örneklerinin %0.9’unda *Salmonella* tespit etmişlerdir. Öksüztepe ve ark.<sup>(29)</sup> Elazığ’da fermente sucuk araştırmasında %3 oranında *Salmonella* spp.’ye rastlamışlardır (100 adet örnek). Yener ve ark.<sup>(30)</sup> 217 et örneğinden 41’inde (%18.8) *Salmonella* izole etmişlerdir. Ertaş ve ark.<sup>(31)</sup> tarafından Kayseri ilinde yapılan bir çalışmada, 100 adet kırmızı etden %4 oranında *Salmonella* spp. izole edilmiştir. Erzurum’da satışa sunulan yaprak dönerlerin mikrobiyolojik kalitesini inceleyen bir çalışmada, Küpeli-Gençer ve Kaya<sup>(32)</sup> tarafından *Salmonella* spp.’ye rastlanmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, Erzurum’da satılan 100 adet sığır kıyma örneği çalışılmış ve *Salmonella* etkenine rastlanılmamıştır<sup>(33)</sup>. Bu çalışmadaki bulgularla uyumlu olarak, Van ve Mersin’de yapılan çalışmalarda *Salmonella* spp. açısından incelenen kıyma örneklerinde bu bakterinin bulunmadığı bildirilmiştir<sup>(34,35)</sup>. Ancak bazı çalışmalarda, kıymalarda *Salmonella* spp.’nin değişen oranlarda bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin,

Ankara’da 120 dana kıyma örneğinden %3.3 oranında ve Erzurum’da 48 kıyma örneğinin %2.08’inde (Et ve Balık Kurumu’ndan alınmıştır) *Salmonella* spp. bulunmuştur<sup>(36,37)</sup>.

*Salmonella*’nın doğru bir şekilde tanımlanması, halk sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Kültür tabanlı yöntemler, biyokimyasal testler ve serotiplendirme gibi geleneksel yöntemler yaygın olarak kullanılmakta ve ilgili standartlar tarafından önerilmektedir. Ancak, *Citrobacter*, *Proteus* ve *Hafnia* spp. gibi bazı türlerin işleme tesislerinde rutin olarak tespit edilmesi, gıda üreticileri için önemli yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir<sup>(15)</sup>. Bu durumlarda, kültürel yöntemlerin yanı sıra eşdeğer moleküler yöntemlerin uygulanması daha etkili bir çözüm olarak görülmektedir.

*Citrobacter* cinsi bakteriler, *Salmonella* spp. ile yakından akrabadır; bu nedenle, hücre yüzey antijenleri ve biyokimyasal özellikler açısından benzerlik gösterebilirler. Çeşitli araştırmalar, *Salmonella* ile *Citrobacter* ve *Hafnia* cinslerinin üyeleri arasında konvensiyonel ve biyokimyasal analizlerde çapraz reaksiyonların meydana geldiğini belgelemektedir. Özellikle, *Citrobacter* ve *Salmonella*’nın belirli serotipleri arasında önemli antijenik benzerlikler olduğu ve bu bulguların önceki araştırmaları doğruladığı belirtilmiştir<sup>(10)</sup>. Pilar ve ark.<sup>(38)</sup>, *Citrobacter* ve *Salmonella* genlerinin yaklaşık üçte birinin ortak olduğunu belirterek bu yakın ilişkiyi doğrulamışlardır. Bu durum, *Citrobacter* cinsi bakterilerin *Salmonella* spp. olarak yanlış tanımlanmasına yol açabilir. Örneğin, *Citrobacter braakii*, XLD agarda *Salmonella*’ya benzer şekilde üreyebilir ve serolojik testlerde otoaglutine olabilir. Pławińska-Czarnak ve ark.<sup>(15)</sup> yaptığı bir çalışmada, biyokimyasal testlerle *Salmonella* olarak tanımlanan 42 izolatin %16.7’sinin *Citrobacter braakii* olduğu doğrulanmıştır.

*Salmonella* testlerinde, bazı hızlı tanı yöntemlerinin *Citrobacter*, *Proteus* ve *Hafnia* türleriyle çapraz reaksiyon verdiği bilinmektedir<sup>(39)</sup>. Ayrıca, bazı çalışmalarla *Salmonella* Locarno ve *Salmonella* Kentucky gibi bazı *Salmonella* serotipleriyle yeni antijenik ilişkileri tespit edilmiştir<sup>(40)</sup>. Yapısal analizler,

*Citrobacter freundii* O35 ve *Salmonella arizonae* O59 lipopolisakaritlerinin (LPS) yapısal olarak aynı olduğunu ve bu benzerliğin çeşitli serolojik testlerde çapraz reaksiyonlara neden olduğunu göstermiştir<sup>(41)</sup>. Bu bulgular, bu cinsler arasında çapraz reaksiyonların varlığını doğrulamakta ve klinik ortamlarda serolojik testler ve tanımlama süreçleri üzerinde önemli etkileri olabileceğini göstermektedir. Bu türlerin işleme tesislerinde rutin olarak tespit edilmesi, gıda üreticileri için önemli ürün ve prestij kayıplarına yol açabilir. Bu tür durumlarda, eşdeğer moleküler yöntemlerin uygulanması en etkili çözüm olabilir<sup>(42)</sup>. Ayrıca, *Citrobacter*, *Proteus*, *Hafnia* gibi türlerin *Salmonella* ile çapraz reaksiyon verme potansiyeli, gıda güvenliği testlerinde yanıltıcı sonuçlara neden olabilmektedir. Bu durum, gıda üreticileri için operasyonel zorluklara yol açabileceği gibi, yanlış teşhis riskini de artırmaktadır. Bu nedenle, çapraz reaksiyonları önlemek için daha spesifik moleküler yöntemlerin uygulanması, doğru tanımlama ve güvenilir test sonuçları elde edilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir.

Sonuç olarak; tüketilmek için pişirilen gıdalarda, hem maruz kaldığı ısıl işlemin etkinliği hem de pişirme sonrasında uygulanan koruma gıda güvenliği çerçevesinde büyük önem taşır. Isıl işleme rağmen canlılığını koruyan veya ürüne ısıl işlemde sonra bulaşan patojenler, müsait şartlar bulduklarında çoğalmaya ve üremeye devam edebilir. Bu mikroorganizmaların doğru tanımlanması da önemli bir unsurdur. Gıdalarda *Salmonella*'nın yanlış pozitif olarak değerlendirilmesini önlemek için alınabilecek önlemler şu şekilde sıralanabilir;

(a) Gelişmiş Moleküler Tekniklerin Kullanımı: Geleneksel kültür ve biyokimyasal yöntemlerin yerine, özgüllüğü daha yüksek olan PCR gibi moleküler tekniklerin kullanılması uygun bir yaklaşımdır.

(b) Optimum Besiyeri Geliştirilmesi: Seçici ve ayırt edici özelliklere sahip, *Salmonella* dışındaki mikroorganizmaların üremesini en aza indiren özel besiyerlerinin tasarlanması, testlerin doğruluğunu artırabilir.

İleri teknoloji temelli tanımlama yöntemleri, örneğin, kütle spektrometrisi (MALDI-TOF) veya hızlı DNA dizileme teknolojileri, *Salmonella* ve benzer organizmaların daha doğru bir şekilde ayrılmasına katkıda bulunabilir.

Bu çalışmada, pişirilmiş döner ve salatalarda *Salmonella* etkeni açısından bir risk olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuç olarak, döner ve salata örneklerinde *Salmonella* spp.'nin tespit edilmemesi önemli bir bulgu olarak öne çıkmaktadır. Elde edilen sonuçlar, piyasada satışa sunulan döner ve salataların, patojen olmayan mikroorganizmalar taşıyabileceğini, ancak pişmiş dönerlerin *Salmonella* spp. gelişimi için uygun bir ortam oluşturmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, bazı analiz sonuçlarında *Salmonella*'ya benzeyen mikroorganizmalar nedeniyle yanlış pozitif bulgular elde edilmiştir. Mevcut mikrobiyotanın ve analiz yöntemlerindeki özgüllük eksikliğinin yanlış sonuçlara yol açabileceği sonuçlardan analımlanmaktadır. Detaylı analizler neticesinde yanlış pozitif sonuçlar teyit edilmiş ve izole edilen etkenlerin *Salmonella* spp. olmadığı doğrulanmıştır. Bu durum analiz yöntemlerinde yanlış pozitif sonuçların daha ileri teknikler kullanılarak azaltılması gerekliliğini göstermektedir.

## TEŞEKKÜR

Yazarlar Sanger dizileme hizmeti için Hydra Biyoteknoloji'ye teşekkür ederler.

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

**Finansman:** Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2021-TS-84 kodlu Araştırma Projesi olarak desteklenmiştir.

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

**Funding:** This research was funded by Kafkas University, Scientific Research Projects Coordination Unit (no: 2021-TS-84).

## KAYNAKLAR

1. Karslıoğlu B, Kolsarıcı N. The effects of fat content and cooking procedures on the PAH content of beef doner kebabs. *Polycycl Aromat Compd.* 2023;43(4):3291-304.  
<https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2067879>
2. Acar MS, Çiftçioğlu GR. Kasaplık hayvan etleri ve tavuk etinden yapılan döner kebablarının mikrobiyolojik kalitesi üzerine bir araştırma. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.* 1997;23(2):395-404.
3. Diğrak M, Gür S, Özçelik S. Elazığ'da tüketime sunulan dönerlerin mikrobiyolojik kalitesi. *Kükem Derg.* 1995;18(2):76-80.
4. Synnott M, Morse DL, Maguire H, et al. An outbreak of *Salmonella mikawasima* associated with doner kebabs. *Epidemiol Infect.* 1993;111(3):473-82.  
<https://doi.org/10.1017/s0950268800057204>
5. Katsurayama AM, Planas PM, Dantas STA, et al. Microbiological quality of "Doner kebab" sold in retail in Sao Paulo-Brazil. *Braz J Dev.* 2020;6(3):11639-48.  
<https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-141>
6. Ziino G, Gurrera G, Beninati C. Microbiological quality of kebabs sold in Palermo and Messina. *Ital J Food Saf.* 2013;2(2):e23-e23.  
<https://doi.org/10.4081/ijfs.2013.e23>
7. Hallaç B. Siirt ili merkezinde satışa sunulan büryan kebabının mikrobiyolojik kalitesi ve bazı fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Adyutayam Derg.* 2022;10(2):135-51.
8. Ssemanda JN, den Besten HM, van Wagenberg CP, Zwietering MH. Quantitative assessment of food safety interventions for *Campylobacter spp.* and *Salmonella spp.* along the chicken meat supply chain in Burkina Faso and Ethiopia. *Int J Food Microbiol.* 2024;415:110637.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110637>
9. Reta GG, Lopes SM, de Aquino NSM, Tondo EC. Quantification of *Salmonella* transfer in cross-contamination scenarios found in chicken slaughterhouses. *Food Microbiol.* 2023;116:104347.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104347>
10. Karakaya A, Gücükoğlu A. Serotype distribution and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from traditional chicken doner kebabs in Türkiye. *Turk J Agric Food Sci Technol.* 2023;11(2):280-6.  
<https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i2.280-286.5638>
11. Upton J, Avırvarei AC, Bottex B, et al. 2023 crisis preparedness training: Annual report. *EFSA Support Publ.* 2023;20(12):8505E.  
<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-8505>
12. Porsyyev H. Karaman'da tüketime sunulan tavuk dönerlerin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi [Yüksek lisans tezi]. Fen Bilimleri Enstitüsü, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, 2019.
13. Cox NA, Berrang ME. Inadequacy of selective plating media in field detection of *Salmonella*. *J Appl Poult Res.* 2000;9(3):403-6.  
<https://doi.org/10.1093/japr/9.3.403>
14. Fatima A, Nawaz S, Shahid M, Saleem M, Fatima I. Designing a rapid, reliable, and reproducible method for the detection of *Salmonella* spp. from poultry meat. *J Microbiol Mol Genet.* 2022;3(2):12-23.  
<https://doi.org/10.52700/jmmg.v3i2.51>
15. Pławińska-Czarnak J, Wódz K, Kizerwetter-Świda M, et al. *Citrobacter braakii* yield false-positive identification as *Salmonella*, a note of caution. *Foods.* 2021;10(9):2177.  
<https://doi.org/10.3390/foods10092177>
16. Sullivan G, Guo X, Tokman JI, et al. Extended enrichment procedures can be used to define false-negative probabilities for cultural gold standard methods for *Salmonella* detection, facilitating comparisons between gold standard and alternative methods. *J Food Prot.* 2020;83(6):1030-7.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-19-422>
17. Rappaport F, Konforti N, Navon B. A new enrichment medium for certain salmonellae. *J Clin Pathol.* 1956;9(3):261-6.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.9.3.261>
18. Cheng CM, Lin W, Van KT, Phan L, Tran NN, Farmer D. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. *J Food Prot.* 2008;71(12):2436-41.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.12.2436>
19. Marmur J, Doty P. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol.* 1961;3(5):585-94.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80023-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80023-5)
20. Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BH, Verhoef J. Evaluation of the magnetic immuno-PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991;10(11):935-8.  
<https://doi.org/10.1007/bf02005447>
21. Fluit AC, Widjoatmodjo MN, Box ATA, Torensma R, Verhoef J. Rapid detection of *Salmonella* in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(5):1342-6.  
<https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1342-1346.1993>

22. Austin B, Austin DA. Enterobacteriaceae representatives. In: Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Springer, Cham. 2016:323-396.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0_6)
23. Türe M, Kutlu I. Isolation of *Citrobacter freundii* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater cage. J Limnol Freshwater Fish Res. 2018;4(2):85-9.  
<https://doi.org/10.17216/limnofish.396496>
24. Asal C. *Salmonella* bakterisinin gıdalarda varlığı. Samsun Sağlık Bilim Derg. 2021;6(1):28-34.  
<https://doi.org/10.47115/jsbs.695685>
25. Hernández M, Ancona S, Hereira-Pacheco S, Díaz de la Vega-Pérez AH, Alberdi A, Navarro-Noya YE. Seasonal dietary changes relate to gut microbiota composition depending on the host species but do not correlate with gut microbiota diversity in arthropod-eating lizards. Mol Ecol. 2024;e17426.  
<https://doi.org/10.1111/mec.17426>
26. Møretrø T, Langsrud S. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2017;16(5):1022-41.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
27. Al G. Sığır kıyma ve köftelerinde *Salmonella spp.* varlığı ve antibiyotik dirençlilik profilleri [Yüksek Lisans Tezi]. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015.
28. Hampikyan H, Ulusoy B, Bingöl EB, Çolak H, Akhan M. İstanbul'da tüketime sunulan bazı ızgara tipi gıdalar ile salata ve mezelerin mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2008;38(2):87-94.
29. Öksüztepe G, Güran HŞ, İncili GK, Gül SB. Elazığ'da tüketime sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. FÜ Sağ Bil Vet Derg. 2011;25(3):107-7.
30. Yener B, Akçelik N, Şanlıbaba P, Akçelik M. Çoklu ilaç dirençli *Salmonella* suşlarının tanısı. Turk Hij Den Biol Derg. 2012;69(4):201-12.  
<https://doi.org/10.5505/turkhijyen.2012.15046>
31. Ertaş N, Abay S, Telli N, Hızlısoy H, Al S. Kayseri'de satışa sunulan sucuklarda *Salmonella spp.* varlığı ve antimikrobiyel direnç profilleri. Fırat Üniv Sağ Bil Vet Derg. 2014;28(1):25-8.
32. Küpeli-Gençer V, Kaya M. Yaprak dönerin mikrobiyolojik kalitesi ve kimyasal bileşimi. Turk J Vet Anim Sci. 2004;28(6):1097-103.
33. Atasever MA, Atasever M. Kıymalarda bazı patojenlerin izolasyon ve identifikasyonu. İstanbul Üniv Vet Fak Derg. 2014;41(1):60-8.  
<https://doi.org/10.16988/iuvfd.2015.79104>
34. Sancak YC, Boynukara B, Ağaoğlu S. Van'da tüketime sunulan kıymaların mikrobiyolojik kalitesi. Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg. 1993;4(1):73-86.
35. Direkel Ş, Yıldız Ç, Aydın FE, Emekdaş G. Mersin ili Yenişehir ilçesinde satışa sunulan çiğ kıymaların mikrobiyolojik kalitesinin değerlendirilmesi. Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg. 2010;3:8-14.
36. Erol İ. Ankara'da tüketime sunulan sığır kıymalarında *Salmonella*'ların varlığı ve serotip dağılımı. Turk J Vet Anim Sci. 1999;23:321-5.
37. Gökalp HY, Yetim H, Karacam H. Some saprophytic and pathogenic bacteria levels of ground beef sold in Erzurum, Turkey. Proceeding of 2nd World Congress of Foodborne Infections and Intoxications, Berlin. 1986:310.
38. Pilar AVC, Petronella N, Dussault FM, et al. Similar yet different: Phylogenomic analysis to delineate *Salmonella* and *Citrobacter* species boundaries. BMC Genomics. 2020;21:377.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-06780-y>
39. Raman R. Evaluation of rapid *Salmonella* immunoassays and characterization of bacterial isolates that cause false-negative and false-positive in the tests [Master's thesis]. McGill University, 2017.
40. Sedlak J, SKlajsova M. On the antigenic relationships of certain *Citrobacter* and *Hafnia* cultures. J Gen Microbiol. 1966;43(1):151-8.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-43-1-151>
41. Kocharova NA, Knirel YA, Stanislavsky ES, et al. Structural and serological studies of lipopolysaccharides of *Citrobacter* O35 and O38 antigenically related to *Salmonella*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996;13(1):1-8.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1996.tb00209.x>
42. Legan JD, Post L, Barnes C, et al. Discrepancies in the microbiological analysis of foods: Causes and resolutions. Food Prot Trends. 2024;44(4):300-8.

# Influenza B Virüslerinin Epidemiyolojisinde Demografi, Antijenik Özellikler ve Filogenetik İlişkilerin Bağlantısı

## Linking Demography, Antigenic Characteristics and Phylogenetic Relationships in the Epidemiology of Influenza B Viruses

Muhammet Ekin Azbazdar<sup>\*,\*\*</sup>, Zeynep Ahsen Koçer<sup>\*,\*\*</sup>

\* Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, Biyotıp ve Sağlık Teknolojileri Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye  
\*\* İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, Yeni Viral Hastalıklar Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

**Atf/Cite as:** Azbazdar ME, Koçer ZA. Influenza B virüslerinin epidemiyolojisinde demografi, antijenik özellikler ve filogenetik ilişkilerin bağlantısı. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):73-92.

### Öz

**Amaç:** Çalışmanın amacı, tam uzunlukta açık okuma çerçevesi açık erişimli GISAID veri tabanında bulunan tüm hemaglutinin (HA) gen dizilerini kullanarak, 2010-2024 yılları arasında Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşan influenza B virüslerinin filogenetik ilişkilerini araştırmaktır. Ayrıca, çalışma mevsimler arası antijenik uzaklıkları belirlemeyi ve demografik bilgilerin dahil edilmesi ile bu faktörlerin influenza B virüslerinin epidemiyolojisi üzerindeki olası etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır.

**Yöntem:** Türkiye, Ukrayna, Yunanistan, Bulgaristan, Gürcistan, Ermenistan, İran ve Suriye'den 2010-2024 yılları arasında veri tabanına yüklenmiş Victoria ve Yamagata soyuna ait tam uzunluktaki HA gen dizileri, MAFFT ile hizalanmış ve filogenetik yakınlıkları ultrafast bootstrap yöntemi (1000 tekrar) ile IQ-TREE arayüzünde analiz edilmiştir. Veri tabanında yer alan demografik bilgiler kullanılarak, hastalar yaş gruplarına göre kategorize edilmiştir. Aynı dizilerin antijenik bölgelerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiş ve sezonlar arası antijenik uzaklıklar Needleman-Wunsch algoritması ile hesaplanmıştır.

**Bulgular:** Victoria soyuna ait virüslerin 0-18 yaş arası çocuk ve gençlerde, Yamagata soyundan virüslerin 19 yaş üstü yetişkinlerde çoğunlukta olduğu belirlenmiştir. Filogenetik analizler, Victoria soyunda sezonlar arası genetik farklılıkların daha belirgin olduğunu, Yamagata soyunda bu farklılıkların daha sınırlı kaldığını göstermiştir. Bu durum, yaş faktörünün yakın coğrafyalardaki virüslerin yayılımında daha az etkili olabileceği ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, Yamagata soyundan virüslerin HA proteinlerindeki antijenik değişimlerin daha stabil olduğu, Victoria soyundan virüslerin ise daha sık ve dinamik değişimler geçirdiği saptanmıştır.

**Sonuç:** Bu çalışma, farklı soylardan influenza B virüslerinin evrimsel dinamiklerinde ve epidemiyolojisinde, HA proteininin antijenik bölgelerinde meydana gelen değişikliklerin önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, Yamagata soyundan virüslerin coğrafi yayılmalarının sınırlı kalmasının ve antijenik yapılarının sezonlar arası korunmuş olmasının, bu soydan virüslerin popülasyondan silinmesine katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** influenza B virüsleri, hemaglutinin, filogenetik

### ABSTRACT

**Objective:** In the present study, we aimed to investigate the phylogenetic relationships of influenza B viruses circulating in Türkiye and neighboring countries from 2010 to 2024 using full-length hemagglutinin (HA) genes available on GISAID. Additionally, we aimed to determine the antigenic distances and evaluate the potential impact of these factors and demographic data on virus epidemiology.

**Methods:** Full-length HA gene sequences of Victoria and Yamagata viruses from Türkiye, Ukraine, Greece, Bulgaria, Georgia, Armenia, Iran, and Syria (2010–2024) were aligned using MAFFT. Phylogenetic relationships were analyzed using IQ-TREE with the ultrafast bootstrap method (1,000 replicates). Patients were categorized into age groups based on demographic data. Antigenic distances between seasons were calculated using the Needleman-Wunsch algorithm.

**Results:** Victoria viruses were predominantly detected in children and adolescents (0–18 years), while Yamagata viruses were more common in adults (19 years and older). Phylogenetic analyses revealed more pronounced genetic differences between seasons for Victoria viruses, whereas Yamagata viruses showed limited variation. This suggested that age might play a less significant role in the spread of viruses within geographically close regions. Furthermore, the antigenic sites of HA proteins in Yamagata viruses were more stable, while those in Victoria viruses showed frequent and dynamic changes.

**Conclusion:** The study demonstrated that changes occurring in the antigenic regions of the HA protein might play a significant role in the evolutionary dynamics and epidemiology of influenza B viruses from different lineages. Moreover, the limited geographic spread and conserved antigenic structures of Yamagata viruses between seasons may contribute to their disappearance from the population.

**Keywords:** influenza B viruses, hemagglutinin, phylogenetics

**Alındığı tarih / Received:**  
21.11.2024 / 21.November.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**  
10.02.2025 / 10.February.2025

**Yayın tarihi / Publication date:**  
24.03.2025 / 24.March.2025

### ORCID Kayıtları

M. E. Azbazdar 0000-0003-1752-3142  
Z. A. Koçer 0000-0001-9178-0142

✉ zeynep.kocer@deu.edu.tr



## GİRİŞ

İnfluenza virüsleri, toplum ve hayvan sağlığı üzerinde ciddi etkiler yaratan önemli viral patojenlerin başında gelmektedir. İnsanlarda dolaşımda olan influenza A ve B virüsleri, her yıl dünya çapında mevsimsel salgınlara yol açarak neredeyse bir milyona yakın vakaya neden olmaktadır<sup>(1)</sup>. İnfluenza B virüsleri, küresel çapta salgınlara yol açmasa da dünya genelindeki mevsimsel influenza kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık dörtte birinden sorumludur<sup>(2)</sup>. Ayrıca, influenza B enfeksiyonlarında karın ağrısı, kusma ve ishal gibi gastrointestinal belirtiler influenza A enfeksiyonlarına kıyasla daha yaygındır<sup>(2)</sup>. H3N2 alt tipli influenza A virüsleri, en yüksek solunum/kardiyovasküler ölüm oranına sahip olsa da (%8.47), H1N1 alt tipli influenza A virüslerinden (%2.83) daha yüksek oranlara sahip olan Yamagata (%5.81) ve Victoria (%3.68) soyuna ait influenza B virüsleri de dikkate değer ölçüde ölüme sebep olmaktadır<sup>(3)</sup>. Ayrıca, hastaneye yatış oranları açısından influenza B virüsleri (%50.1), 5–17 yaş grubunda H1N1 alt tipli influenza A virüsleri (%55.3) ile benzer düzeylerde seyretmektedir<sup>(4)</sup>. Bu bulgular, influenza B virüslerinin toplum sağlığı açısından ne denli önemli olduğunu gözler önüne serse de bu virüslerin epidemiyolojik özellikleri ve antijenik dinamikleri yeterince anlaşılamamıştır.

İnfluenza B virüslerinin genomu, negatif-polariteli tek-sarmallı RNA molekülünden oluşan sekiz ayrı gen parçasından meydana gelmektedir. Bu gen parçalarından temel olarak PB2, PB1, PA, HA, NP, NB, NA, M1, BM2, NS1 ve NEP proteinleri üretilmektedir<sup>(5)</sup>. Virüs genomunun replikasyonu sırasında, RNA-bağımlı RNA-polimerazın hataya meyilli yapısı ve/veya konak bağışıklık sistemi baskısı nedeniyle amino asit değişimleriyle sonuçlanan genetik ve antijenik değişimler meydana gelebilmektedir. Viral genomda meydana gelen pozitif veya negatif seçimler, yani virüse avantaj ya da dezavantaj sağlayabilecek değişimler sonucu, viral popülasyonların antijenik ve genetik yapısının değişmesi mümkündür. Bu değişimlerden belki de en önemlisi, influenza B virüslerinin Victoria ve Yamagata olmak üzere iki farklı genetik soya ayrılmasıdır<sup>(6)</sup>. Ancak, 2019 yılı itibarı ile dünyayı etkisi altına alan COVID-19 pandemisi sonrası dünya genelinde Yamagata soyuna ait influenza B virüslerinde belirgin bir azalma

tespit edilmiştir<sup>(7,8)</sup>. Bu durum, Yamagata soyuna ait virüslerin popülasyondan silinmiş olabileceğini ve gelecekte yalnızca Victoria soyuna ait virüslerin enfeksiyona yol açabileceğini düşündürmektedir<sup>(7,8)</sup>.

Viral genom tarafından üretilen proteinler arasında antijenik açıdan en önemli olanı hemaglutinin (HA) proteindir. Bu nedenle, bağışıklığın sağlanmasında aşı bileşeni olarak HA proteini tercih edilmektedir<sup>(9)</sup>. HA proteinindeki kritik antijenik bölgeler, 120. (pozisyon 116-137), 150. (pozisyon 141-150) ve 160. (pozisyon 162-167) kıvrımlar ile 190. (pozisyon 194-202) sarmalda yer almaktadır<sup>(10-12)</sup>. Bağışıklık sistemi tarafından üretilen nötralizan antikorlar genellikle bu bölgeleri hedef aldığından, bu bölgelerde meydana gelen değişiklikler antijenik sürüklenmeye neden olarak virüsün konak bağışıklık sisteminden kaçmasını kolaylaştırabilmektedir. Epidemiyolojik açıdan değerlendirildiğinde, Victoria ve Yamagata soylarına ait virüslerin farklı evrimsel stratejiler izlediği de bilinmektedir<sup>(13)</sup>. Örneğin, HA geninde meydana gelen nükleotid silinmeleri, Victoria soyundaki virüslerin antijenik özelliklerini daha çok etkilerken, Yamagata soyundaki virüslerde daha az etkiye sahiptir<sup>(13)</sup>. Özellikle 2016-2017 influenza sezonundan itibaren Victoria soyuna ait virüslerin HA proteinlerinin antijenik bölgelerinde iki (pozisyon 162-163) ya da üç amino asitlik (pozisyon 162-164) silinmeler olmuştur<sup>(14)</sup>. Sadece birkaç sezon içerisinde baskın hale gelen bu silinmeler, Victoria soyuna ait virüslerin antijenik yapısını önemli ölçüde değiştirmiştir<sup>(14-17)</sup>. Daha da dikkat çekici olan, üç amino asitlik silinme içeren HA proteinlerinin, aşılardan sonra insanlardan toplanan antikorlarla çarpaz reaktivitesinde belirgin bir azalma göstermesidir<sup>(18)</sup>.

İnfluenza B virüslerinin epidemiyolojisini ve yayılımını etkileyen bir diğer faktör ise Victoria ve Yamagata soylarının farklı yaş gruplarını etkilemesidir. Küresel düzeyde 12.000'den fazla virüsün incelendiği bir çalışma, Victoria soyuna ait virüs enfeksiyonlarının en sık beş yaşındaki çocuklarda görüldüğünü ortaya koymuştur<sup>(13)</sup>. Buna karşın, Yamagata soyuna ait enfeksiyonlar 30 yaş üstü bireylerde daha yoğun bir dağılım göstermektedir<sup>(13)</sup>. Aynı çalışmadaki bir diğer çarpıcı sonuç ise, Yamagata soyuna ait virüslerin kıtalar arası yayılımının, Victoria soyuna

ait virüslere göre belirgin bir şekilde daha fazla olduğudur<sup>(13)</sup>. Bunun sebebinin, Victoria soyuna ait virüslerin yoğunluklu olarak çocuklarda hastalık oluşturması ve küresel virüs yayılımında yetişkinlerin daha etkin rol oynaması olarak görülmektedir<sup>(13,19-21)</sup>. Bu görüşü destekler nitelikte, bir başka çalışmada, Yamagata soyuna ait virüslerin ev halkı arasındaki geçişkenlik riskinin tüm yaş grupları için eşit olduğu, Victoria soyuna ait virüslerde ise bu riskin 15 yaş altı çocuklarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>(22)</sup>. İnfluenza virüs enfeksiyonlarında yüksek riskli gruplardaki kişiler, ölümlerle sonuçlanabilecek şiddetli hastalık geliştirme bakımından toplumun diğer bireylerinden daha yüksek riske sahiptir<sup>(23)</sup>. Altı ay ila beş yaş arasındaki çocuklar, 65 yaş üstü bireyler, hamileler, bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler ve kronik tıbbi rahatsızlıkları olanlar bu gruplara dahildir<sup>(23)</sup>. Victoria soyuna ait virüslerin yüksek riskli gruplardaki çocukları enfekte edebileceği düşünüldüğünde, bu virüslerde meydana gelen genetik ve antijenik değişimlerin takibi daha da büyük önem kazanmaktadır. Bu kapsamda “Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)” koordinatörlüğünde çalışmalarını sürdüren “Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID)” veri tabanına tüm ülkelere yüklenen veriler oldukça değerlidir.

Bu çalışmanın ana amacı, GISAID veri tabanına günümüze kadar yüklenmiş, açık erişimli ve tam uzunluktaki HA gen dizilerini kullanarak, farklı yıllarda Türkiye’de dolaşımda olan influenza B virüslerinin, komşu ülkelerdeki virüsler ile genetik ve antijenik benzerliklerinin yanı sıra filogenetik ilişkilerinin incelenmesi, bu sayede coğrafi yakınlığın bölgesel virüs dinamiklerine etkisine dair ilişkilerin sunulmasıdır. Bilgimiz dahilinde Türkiye’ye özgü olarak daha önce bu açıdan incelenmemiş influenza B virüslerinin antijenik özelliklerinin daha iyi anlaşılması hedeflenmiştir. Böylece bu çalışma, gelecekte daha geniş coğrafyaları içeren ve ticaret yolları, uluslararası seyahat gibi farklı faktörleri dikkate alan araştırmalara temel oluşturma potansiyeline sahiptir. Bunun yanı sıra, COVID-19 pandemisi sonrası popülasyondan kaybolan Yamagata ve küresel düzeyde baskın hale gelen Victoria soyuna ait virüslerin HA proteinlerindeki antijenik değişimlerin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında ayrıca, yine GISAID veri tabanında yer alan bilgilere dayalı, çalışma grubu olarak belirlenen Yamagata ve Victoria soylarına ait influenza B virüslerinin sezonlara, ülkelere ve virüslerin saptandığı hastaların yaş gruplarına göre dağılımları incelenerek, yaş gruplarının ve coğrafi konumların virüsün epidemiyolojisine katkısının anlaşılması amaçlanmıştır. Türkiye’de dolaşımda olan influenza B virüslerini biyoinformatik yöntemlerle inceleyen bu çalışmanın, gelecekte yapılacak *in vitro* araştırmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Verinin seçim kriterleri:** Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımda olan mevsimsel influenza B virüslerinin genetik ve antijenik benzerliklerinin saptanması ve filogenetik ilişkilerinin araştırılması amacıyla, tam uzunluktaki tüm HA gen dizileri ile, var ise, bu virüslerin saptandığı hastaların yaş bilgileri, başlangıç tarihi belirtilmeksizin, GISAID veri tabanından elde edilmiştir (Erişim tarihi: 31 Ağustos 2024). Seçilen ülkelerin coğrafi olarak Türkiye’ye yakın ülkeler olmasına dikkat edilmiş ve Türkiye’nin yanı sıra sınır komşusu olan Yunanistan, Bulgaristan, Gürcistan, Ermenistan, İran ve Suriye’de dolaşımda olan influenza B virüslerinin HA gen dizileri çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Sınır komşusu olmamasına rağmen Türkiye’nin kuzeyini temsil etmesi adına Ukrayna’da dolaşımda olan influenza B virüsleri de analizlere eklenmiştir. Yukarıda belirtilen tarihler arasında erişime açık tüm gen dizileri indirilmiş olmasına rağmen, 2009-2010 sezonu ve öncesinde yalnızca Ukrayna için veri girişi mevcuttur. Bu sebeple, çalışmaya sadece 2010-2011 sezonu ve sonrasında saptanan influenza B virüsleri dahil edilmiştir.

**Virüslerin antijenik soylara, yıllara, ülkelere ve yaş gruplarına göre dağılımı:** Çalışma grubu olarak belirlenen influenza B virüslerinin HA genleri soylara göre filtrelenerek GISAID veri tabanından indirilmiştir. Veri tabanında, aynı virüs suşunun klinik örnekten elde edilmiş dizisinin yanı sıra farklı pasajlarından temin edilmiş gen dizileri de bulunabileceği için, virüsler yıllara, ülkelere ve yaş gruplarına göre kategorize edilmeden önce aynı virüs için tekrar eden diziler elenmiş ve her bir virüs için sadece bir HA gen

dizisi analizlerde kullanılmıştır. Bu doğrultuda, ilk olarak klinik örnekten elde edilen dizi seçilmiş, klinik örneğe ait herhangi bir dizi yok ise en düşük sayılı hücre kültürü pasajından izole edilen virüsün HA gen dizisi tercih edilmiştir. Çalışma grubunda bulunan her bir ülkedeki virüsler: 1) soylara ve sezonlara göre ve 2) soylara ve virüslerin saptandığı hastaların yaş gruplarına (0-5, 6-10, 11-18, 19-65 ve 65 yaş üstü) göre kategorize edilmiştir. Virüslerin tespit edildiği hastalara ait herhangi bir yaş bilgisi veri tabanında belirtilmemiş ise grafiklerde “belirtilmemiş” olarak tanımlanmıştır. Tüm ülkelerdeki hastaların farklı yaş guruplarındaki sayılarının ortalaması alınarak grafiklerde belirtilmiştir. Ülkelere ve soylara göre gruplanan yaş dağılımları, yüzdesel değerlere dönüştürülerek GraphPad Prism (v10.1.0, Dotmatics) programında görselleştirilmiştir.

**Maksimum olabilirlik filogenetik analizleri:** Seçilim kriterlerine göre belirlenen ve GISAID veri tabanında erişime açık olan Victoria ve Yamagata soylarına ait influenza B virüslerinin nükleotid düzeyindeki genetik yakınlıkları, HA gen dizilerinin maksimum olabilirlik (maximum likelihood) filogenetik analizlerine tabi tutulması ile değerlendirilmiştir. İnfluenza B virüslerine ait tam uzunluktaki HA gen dizileri, GISAID veri tabanından soylara göre filtrelenerek indirilmiş ve Unipro UGENE (v48.0) programındaki MAFFT eklentisi kullanılarak çoklu dizi hizalamasına tabi tutulmuştur<sup>(24)</sup>. Açık okuma çerçevesi dışında kalan nükleotidler çıkartılmış ve toplam uzunluğu Victoria soyu için 1758 baz ve Yamagata soyu için 1755 baz olacak şekilde hizalanmış gen dizileri elde edilmiştir. Okuma kalitesi düşük olan, yani okunmamış nükleotid sayısı ikiden fazla olan diziler ve “A”, “T”, “G” ve “C” dışında karakter içeren diziler filogenetik analiz sonuçlarının yanlış yorumlanmaması adına çalışma dışında bırakılmıştır. Maksimum olabilirlik filogenetik analizleri IQ-TREE arayüzünde<sup>(25)</sup>, 1000 tekrar olacak şekilde ultrafast bootstrap (UFBoot) yöntemi<sup>(26)</sup> kullanılarak ve ModelFinder<sup>(27)</sup> ile en uygun yer değiştirme modeli seçilerek (K3Pu+F+G4) gerçekleştirilmiştir. En uygun model, test edilen modeller arasında en yüksek “Bayesian Information Criterion (BIC)” değerine sahip modelin algoritma tarafından otomatik olarak seçilmesi ile belirlenmiştir.

Son olarak, filogenetik ağaçlar Interactive Tree of Life (ITOL) (v6) arayüzünde görselleştirilmiştir<sup>(28)</sup>. Bootstrap değeri %50'nin altında kalan dallar analizin güvenilirliğini artırmak amacıyla ağaçtan çıkarılmıştır.

**Virüslerin HA genine göre sezon içi antijenik değişimlerinin belirlenmesi:** Her bir sezondaki antijenik değişimlerin incelenmesi için maksimum olabilirlik filogenetik analizlerinde kullanılan ve hizalanmış olan HA gen dizileri, Unipro UGENE (v48.0) programı kullanılarak amino asit dizilerine çevrilmiştir<sup>(24)</sup>. İnfluenza B virüslerinin HA proteinlerinin numaralandırılmasına sinyal peptidinin çıkartılması sonrası başlanmaktadır. Bu nedenle, çalışma grubundaki virüslerin HA protein numaralandırılması, 1. ve 15. amino asit pozisyonları arasındaki sinyal peptidinin çıkarılmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Her bir soy için antijenik bölgelerin pozisyonları ayrı ayrı saptanmış ve bu pozisyonlardaki değişimler her bir sezon için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Antijenik bölgeler, literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda belirlenmiştir<sup>(10-12)</sup>: 120. (pozisyon 116-137), 150. (pozisyon 141-150) ve 160. (pozisyon 162-167) kıvrımlar ile 190. (pozisyon 194-202) sarmal. Tespit edilen amino asit varyasyonları, sezon içerisindeki toplam virüs sayısına bölünerek varyasyonların frekansları belirlenmiştir.

**Virüslerin HA genlerine göre sezonlar arası antijenik uzaklıklarının hesaplanması:** Çalışma kapsamındaki Victoria ve Yamagata soyuna ait virüslerin sezonlar arası antijenik uzaklıklarının hesaplanması için Needleman-Wunsch algoritması kullanılmıştır<sup>(29)</sup>. Antijenik uzaklıkları araştırmak için deneysel olarak Hemaglütinasyon İnhibisyonu (HI) testleri ve buna bağlı antijenik kartografi incelemeleri yapılmaktadır<sup>(30-32)</sup>. Ancak, ön verilerin hızlıca elde edilmesi için HI testlerinin yanı sıra dizi bazlı analizler ve belirli bir gendeki korunmuşluk oranlarının incelenmesi de tercih edilebilmektedir<sup>(33,34)</sup>. Bu analizler, Hamming ve Needleman-Wunsch gibi yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir<sup>(35-38)</sup>. Sezonlar arası antijenik uzaklıklar, bir sezondaki tüm virüslerin antijenik bölgelerinde saptanan ortalama değişikliklerin, bir diğer sezondaki tüm virüslerin antijenik bölgelerindeki ortalama değişikliklerin

karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Antijenik bölgeler, literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda değerlendirilmiştir<sup>(10-12)</sup>: 120. (pozisyon 116-137), 150. (pozisyon 141-150) ve 160. (pozisyon 162-167) kıvrımlar ile 190. (pozisyon 194-202) sarmal. Sezonlar arası antijenik uzaklıklar aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır<sup>(29-39)</sup>:

$$d(\text{dizi1}, \text{dizi2}) = \sum_{i \in \text{Antijenik Bölgeler}} \delta(\text{dizi1}[i] \neq \text{dizi2}[i])$$

$d(\text{dizi1}, \text{dizi2})$ , iki dizi arasındaki toplam antijenik farklılığı ifade ederken  $\delta(\text{dizi1}[i], \text{dizi2}[i])$  Kronecker delta fonksiyonu olarak tanımlanmıştır:  $\delta(a, b)$  için  $a \neq b$  ise 1 (uyumsuzluk),  $a = b$  ise 0 (eşleşme) şeklindedir.

Farklı uzunluktaki antijenik bölgeleri karşılaştırmayı kolaylaştırmak için, elde edilen sonuçlar toplam antijenik pozisyon sayısına göre normalize edilmiştir. Elde edilen değerler 0 ila 1 arasında ölçeklendirilmiş ve antijenik uzaklık matrisi oluşturulmuştur. Bu değerlerin sıfıra yakın olması sezonlar arası antijenik uzaklığın az olduğu anlamına gelirken bire yakın olması birçok farklı pozisyonda değişim olduğunu ve antijenik uzaklığın fazla olduğunu göstermektedir. Normalizasyon ve ölçeklendirme için aşağıdaki formüller kullanılmıştır<sup>(39-40)</sup>:

$$\text{Normalizasyon} = \frac{d(\text{dizi1}, \text{dizi2})}{L_{\text{Antijenik Bölgeler}}}$$

$$\text{Ölçeklendirilmiş Uzaklık} = \frac{d(\text{dizi1}, \text{dizi2}) - d_{\text{minimum}}}{d_{\text{maksimum}} - d_{\text{minimum}}}$$

$L_{\text{Antijenik Bölgeler}}$  karşılaştırılan antijenik bölgelerdeki toplam pozisyon sayısını ifade ederken  $d(\text{dizi1}, \text{dizi2})$  iki sezon arasındaki ham uzaklığı,  $d_{\text{minimum}}$  uzaklık matrisindeki minimum uzaklığı ve  $d_{\text{maksimum}}$  uzaklık matrisindeki maksimum uzaklığı temsil etmektedir.

Sezonlar arası antijenik uzaklıkların istatistiksel ilişkilerini değerlendirmek amacıyla korelasyon matrisi analizi yapılmıştır. Bu analiz, GraphPad Prism (v10.1.0, Dotmatics) uygulaması kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Pearson korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Pearson r değerleri, iki değişken arasındaki doğrusal ilişkiyi ifade etmekte ve -1 ile 1 arasında değişmektedir: -1 değeri negatif doğrusal

bir ilişkiyi, 1 değeri pozitif doğrusal bir ilişkiyi, 0 ise iki değişken arasında doğrusal bir ilişki olmadığını belirtir. Bu katsayıların istatistiksel anlamlılığı, p-değerleri ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık dereceleri, p-değerlerine göre şu şekilde sınıflandırılmıştır: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Korelasyon matrisi sonuçları yine GraphPad Prism (v10.1.0, Dotmatics) uygulaması ile görselleştirilmiş ve verilerin daha kolay yorumlanabilmesi için ısı harita (heatmap) formatında sunulmuştur.

## BULGULAR

**Influenza B virüslerinin ülkelere, sezonlara, hasta yaş gruplarına ve soylara göre incelenmesi:** Bu çalışmada, 2010-2024 yılları arasında dolaşımda olan influenza B virüslerinin Türkiye ve komşu ülkelerdeki filogenetik ilişkilerinin yanı sıra HA geninde meydana gelen antijenik değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bilgiler, GISAID veri tabanında yer alan demografik verilerle ilişkilendirilerek influenza B virüslerinin epidemiyolojisi incelenmiştir. Çalışmada kullanılan HA gen dizileri, veri tabanından soylara göre filtrelenerek indirilmiş, soylara, ülkelere, sezonlara ve hasta yaş gruplarına göre sayısal olarak değerlendirilmiştir.

HA gen dizileri ülkelere göre incelendiğinde, verilerin büyük bir kısmının Ukrayna'dan yüklendiği ( $n=356$ ) tespit edilmiştir. Türkiye ( $n=113$ ), Yunanistan ( $n=117$ ), Bulgaristan ( $n=90$ ), Gürcistan ( $n=63$ ), Ermenistan ( $n=43$ ), İran ( $n=29$ ) ve Suriye'den ( $n=14$ ) yüklenen diziler, Ukrayna'yı takip etmektedir (Tablo 1). Tüm sezonlar dikkate alındığında, GISAID veri tabanına Ukrayna (237/356), Yunanistan (59/117), Bulgaristan (63/90), Gürcistan (40/63) ve Suriye'den (14/14) yüklenmiş dizilerde Victoria soyuna ait virüslerin baskın olduğu, Türkiye (70/113), Ermenistan (29/43) ve İran'dan (20/29) yüklenmiş dizilerde ise Yamagata soyunun daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Soyların sezonlara göre dağılımı incelendiğinde, Victoria soyuna ait virüslerin çoğu sezonda (8/13) baskın olduğu görülmüştür (Tablo 1). Çalışmaya dahil edilen ülkelerden GISAID veri tabanına yüklenen Victoria soyuna ait HA gen dizisi en fazla 2016-2017

**Tablo 1. Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımda olan influenza B virüslerinin ülkelere, sezonlara ve soylara göre dağılımları**

Sezon	Ülkeler/Virüs Sayıları <sup>a</sup>																
	Türkiye		Ukrayna		Yunanistan		Bulgaristan		Gürcistan		Ermenistan		İran		Suriye		
	V	Y	V	Y	V	Y	V	Y	V	Y	V	Y	V	Y	V	Y	
2023-2024	4		64	1	10		3										
2022-2023	1		21		7		25				5		3			14	
2021-2022			3														
2019-2020	4		12		8		10		11		6		1				
2018-2019	1	1			2	5			3			5	1	2			
2017-2018	1	36	56	17		33	2	16		9		22		2			
2016-2017	12	7	51	4	19		2		11		3		1	2			
2015-2016	15		3		8		20		7				1	2			
2014-2015		10		67		14		5		8				5			
2013-2014	3	6		7						4				3			
2012-2013				23		1		6	3	2		2	1	3			
2011-2012		1	3		4	5			4								
2010-2011	2	9	24		1		1		1				1	1			
TOPLAM	43	70	237	119	59	58	63	27	40	23	14	29	9	20	14		
	113		356		117		90		63		43		29		14		

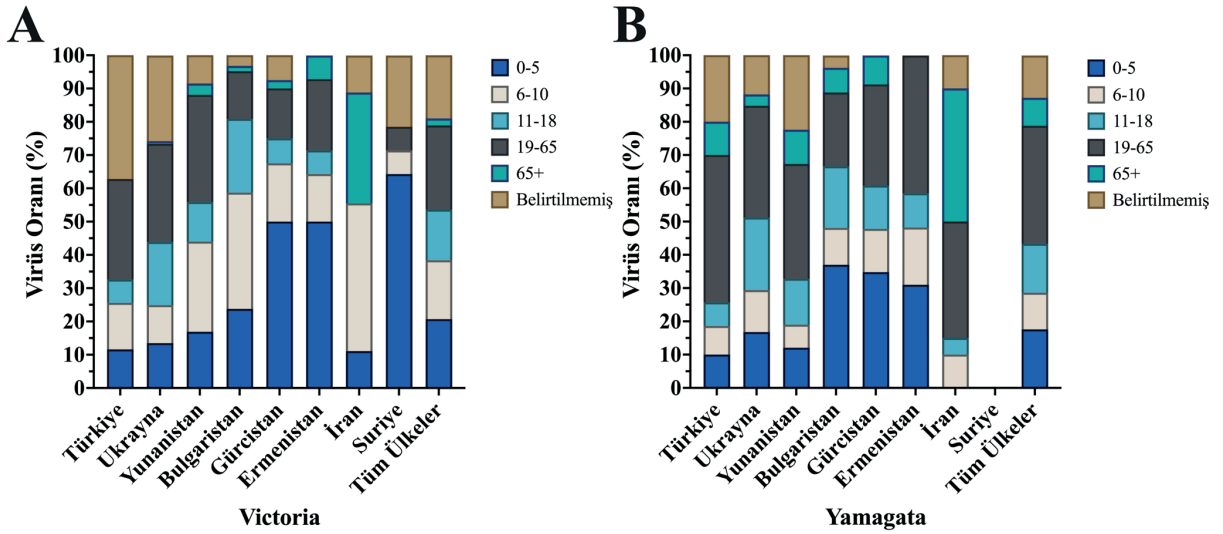
<sup>a</sup>Victoria ve Yamagata soylarına ait virüslerin sayıları her bir ülke için sırasıyla V ve Y sütunlarında belirtilmiştir.

sezonu için bulunurken (n=99), Yamagata soyuna ait virüsler için en fazla dizinin 2017-2018 sezonunda yüklendiği belirlenmiştir (n=135) (Tablo 1). Bununla birlikte, Yamagata soyuna ait diziler 2018-2019 sezonunda belirgin bir düşüş yaşamış (n=13) ve bu sezondan sonra yalnızca 2023-2024 sezonunda Ukrayna'dan yüklenen bir HA dizisi tespit edilmiştir (Tablo 1). Ancak, söz konusu dizi kalite kriterlerini karşılamadığı için filogenetik ve antijenik analizlerde kullanılamamıştır.

Veri tabanına yüklenmiş HA gen dizilerinin ait olduğu hastaların yaş bilgileri incelenmiş ve yaş grupları 0-5, 6-10, 11-18, 19-65 ve 65 yaş üstü olarak kategorize edilmiştir. Grafiklerde, virüs soyları temel alınarak yaş gruplarına göre dağılımlar görselleştirilmiştir (Şekil 1). Bazı hastaların yaş bilgisi veri tabanında yer almadığı için bu grup "belirtilmemiş" olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1).

Victoria soyuna ait virüslerin saptandığı hastalarda tüm ülkelerde genel dağılıma bakıldığında, %53.7 ile en geniş grubu 0-18 yaş arasındaki çocuk ve gençlerin oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1A). Ancak ülkeler bazında incelendiğinde, virüs saptanan hastaların yaş gruplarında farklı dağılımlar gözlenmiştir. Yunanistan, Türkiye ve Ukrayna'da, en yüksek oranlar 19-65 yaş aralığında gözlemlenmiştir (sırasıyla %32.2, %30.2 ve %29.5) (Şekil 1A). Öte yandan, Bulgaristan ve İran'da en yüksek oranlar 6-10 yaş grubunda görülürken (sırasıyla %34.9 ve %44.4), Gürcistan, Ermenistan ve Suriye'de en yüksek oranlar 0-5 yaş grubunda gözlemlenmiştir (sırasıyla %50, %50 ve %64.3) (Şekil 1A).

Yamagata soyuna ait virüsler 18 yaş altı veya üstü olarak incelendiğinde, Ukrayna (%51.3), Bulgaristan (%66.7), Gürcistan (%60.9) ve Ermenistan'da (%58.6) 0-18 yaş grubundaki hastaların (0-5, 6-10 ve 11-18



Şekil 1. Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımda olan influenza B virüslerinin elde edildiği hastalara ait GISAID veri tabanında bulunan yaş bilgileri. Victoria (A) ve Yamagata (B) virüslerinin saptandığı hastaların yaşları beş farklı grupta kategorize edilmiştir (0-5 yaş: koyu mavi, 6-10 yaş: bej, 11-18 yaş: açık mavi, 19-65 yaş: gri ve 65 yaş üstü: turkuaz). Herhangi bir yaş bilgisi veri tabanında belirtilmemiş hastalara ait virüslerin oranı kahverengi ile gösterilmiştir. Türkiye dışındaki ülkeler toplam virüs sayılarına göre soldan sağa doğru sıralanmış, tüm ülkelerdeki hastaların ortalamasını gösteren bulgular son sütunlarda verilmiştir.

yaş); Türkiye (%54.3), Yunanistan (%44.8) ve İran'da (%75) ise 19 yaş üstü hastaların (19-65 ve 65 yaş üstü) çoğunluğu oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 1B). Ancak, hastalar alt kategorilere ayrıldığında (0-5, 6-10, 11-18, 19-65 ve 65 yaş üstü), Türkiye, Ukrayna, Yunanistan, Ermenistan ve İran'da çoğunluk 19-65 yaş grubunda iken (sırasıyla %44.3, %33.6, %34.5, %41.4 ve %35), Bulgaristan ve Gürcistan'da çoğunluk 0-5 yaş grubundadır (sırasıyla %37 ve %34.8) (Şekil 1B). Tüm ülkelerdeki hastaların ortalaması alındığında ise, %43.9 ile 19 yaş üstündeki hastaların daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 1B).

#### Türkiye'de dolaşımda olan influenza B virüslerinin komşu ülkelerdeki virüslerle filogenetik yakınlıkları:

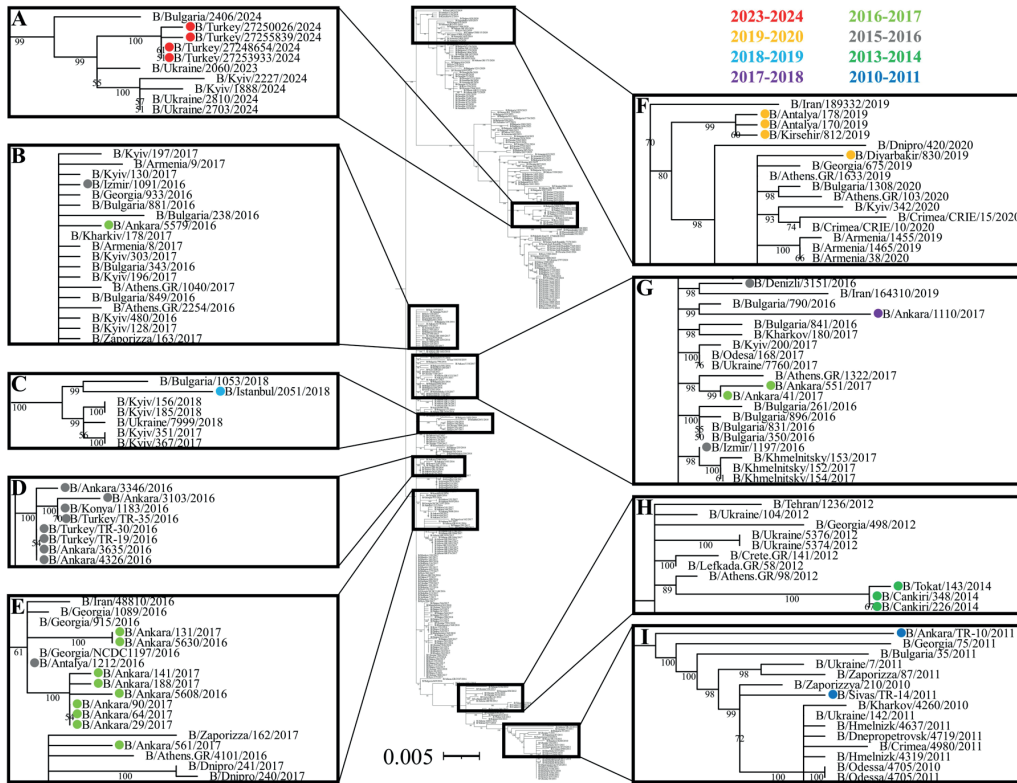
Türkiye ve seçim kriterlerine uygun tüm ülkelerde farklı sezonlarda saptanmış Victoria (n=386) ve Yamagata (n=331) soylarına ait influenza B virüslerinin HA gen dizileri, genetik benzerliklerinin araştırılması amacıyla maksimum olabilirlik filogenetik analizlerine tabi tutulmuştur. Analizler, Türkiye'de saptanmış Victoria (n=39) ve Yamagata (n=69) soylarına ait virüslerin, komşu ülkelerdeki virüsler ile genetik yakınlıklarını incelemenin yanı

sıra, çalışma grubundaki tüm virüslerin yıllara ve soylara özgü viral dinamiklerini ortaya koymuştur. Suriye'ye ait Yamagata soyundan hiçbir HA gen dizisi veri tabanında bulunmadığından, bu ülke analizlere dahil edilememiştir.

Türkiye'deki Victoria soyuna ait virüslerin sekiz farklı sezonda dolaşım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2). 2022-2023 sezonunda Türkiye'de dolaşımda olan HA gen dizisi kalite kriterlerini karşılamadığı için bu sezon için filogenetik analizlerde herhangi bir değerlendirme yapılamamıştır. Çalışmaya dahil edilen Victoria soyuna ait tüm HA dizileri ile yapılan filogenetik analizler, virüslerin genel olarak genetik açıdan ülkelere göre farklılık göstermediğini, ancak 2015-2018 yılları hariç, sezonlara göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 2). 2023-2024 sezonunda Türkiye'de saptanan dört virüs, aynı kladda yer aldığı Bulgaristan ve Ukrayna'daki virüslere genetik benzerlik göstermiştir (Şekil 2A). 2019-2020 sezonunda, bir virüsün aynı sezondaki diğer üç virüsten genetik olarak az da olsa farklılık gösterdiği ve bu sezondaki virüslerin, İran, Gürcistan, Yunanistan, Bulgaristan, Ukrayna ve Ermenistan'da

dolaşımında olan virüslerle genetik olarak yakın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2F). 2018-2019 ve 2017-2018 sezonlarında Türkiye’den yüklenen virüs HA dizilerinin, Bulgaristan’daki virüslerin HA dizilerine genetik olarak daha yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 2C ve 2G). Ayrıca, 2017-2018 sezonunda Türkiye’de saptanan virüsün, 2015-2017 sezonlarında ülkede dolaşımında olan virüsler ile genetik benzerlik taşıdığı gösterilmiştir (Şekil 2G). Filogenetik analizler, 2016-2017 sezonunda dolaşımında olan virüslerin üç klada ayrıldığını ve genetik açıdan oldukça çeşitli bir yapı sergilediğini göstermektedir (Şekil 2B, 2E ve 2G). Bu sezondaki virüslerden birinin Ukrayna, Ermenistan, Gürcistan, Bulgaristan ve Yunanistan’daki virüslerle (Şekil 2B), iki virüsün Yunanistan’daki bir virüsle (Şekil 2G), dokuz virüsün ise İran, Gürcistan, Yunanistan ve Ukrayna’daki virüslerle genetik olarak yakın olduğu

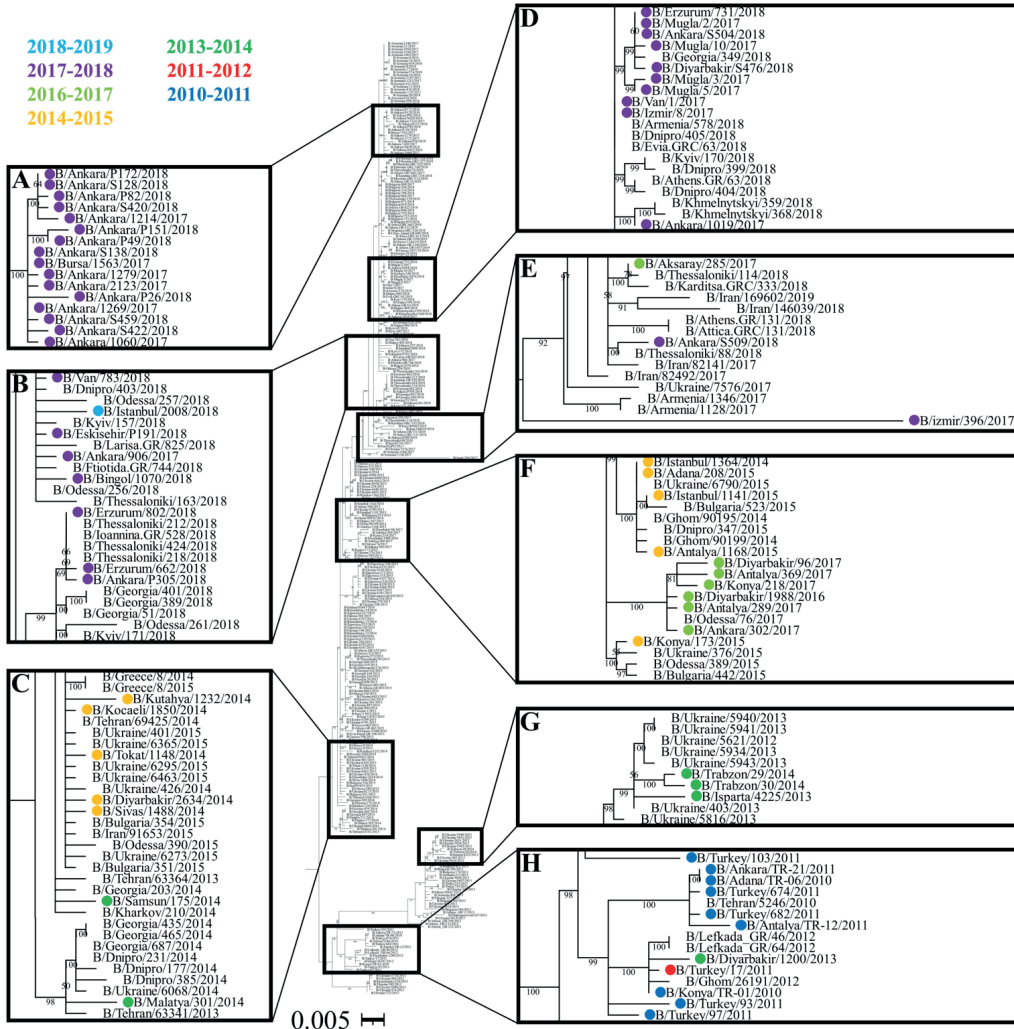
belirlenmiştir (Şekil 2E). 2015-2016 sezonundaki sekiz virüsün ayrı bir klada ayrıldığı (Şekil 2D), iki virüsün 2016-2017 ve 2017-2018 sezonlarındaki virüslerle genetik yakınlık gösterdiği (Şekil 2G) ve bir virüsün 2016-2017 sezonundan virüslerin çoğunluğu oluşturduğu bir klada yer aldığı (Şekil 2E) belirlenmiştir. Ayrıca, 2015-2016 sezonunda Türkiye’de dolaşımında olan virüslerin aynı veya farklı sezonlarda Ukrayna, Ermenistan, Gürcistan, Bulgaristan, Yunanistan, İran’da dolaşımında olan virüsler ile genetik yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2D, 2E ve 2G). Son olarak, 2013-2014 sezonunda Türkiye’de dolaşımında olan virüslerin Yunanistan’daki, 2010-2011 sezonunda dolaşımında olan virüslerin ise Ukrayna, Bulgaristan ve Gürcistan’daki virüslerle genetik olarak yakın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2H ve 2I).



**Şekil 2.** Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımında olan Victoria soyuna ait virüslerin HA genlerine göre filogenetik ilişkileri. Çalışma kapsamındaki influenza B virüslerinin HA genleri GISAID veri tabanından indirilmiştir ve maksimum olasılıklı (maximum likelihood) yöntemi ile filogenetik analize tabi tutulmuştur. Analiz, IQ-TREE arayüzünde, UFBoot kullanılarak ve ModelFinder ile en uygun model seçilerek (K3Pu+F+G4) gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç ITOL kullanılarak görselleştirilmiştir. Türkiye’de saptanan her bir Victoria soyuna ait virüs kutucuklar içerisinde detaylıca gösterilmiştir (A-I). 2022-2023 sezonu için kırmızı (A), 2019-2020 sezonu için turuncu (F), 2018-2019 sezonu için açık yeşil (C), 2017-2018 sezonu için mor (G), 2016-2017 sezonu için yeşil (E), 2015-2016 sezonu için gri (B, D, E, G), 2013-2014 sezonu için koyu yeşil (H) ve 2010-2011 sezonu için koyu mavi (I) daireler virüs isimlerinin önlerine eklenmiştir. Her bir sezon için renk açıklaması şeklinin sağ üst bölümünde verilmiştir. Bootstrap değeri %50’nin üstünde olan dallar analiz kapsamında tutulmuş ve her bir dala ait bootstrap değeri dalların yanına eklenmiştir. Bootstrap değeri %50’nin altında kalan dallar ise analizin güvenilirliğini artırmak amacıyla ağaçtan çıkarılmıştır. Filogenetik ağacın altında belirtilen ölçek, 0.005 nükleotid değişimi olan mesafeyi temsil etmektedir.

Türkiye'deki Yamagata soyuna ait virüslerin yedi farklı sezonda dolaşımında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). Çalışma grubundaki Yamagata soyuna ait tüm HA dizileri ile yapılan filogenetik analizler, virüslerin genel olarak genetik açıdan hem ülkelere hem de 2014-2019 yılları arasında sezonlara göre farklılık göstermediğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 3). 2018-2019 sezonunda bir virüs, 2017-2018 sezonundaki virüslerle aynı kladda yer almış ve Ukrayna'daki virüslerle genetik yakınlık göstermiştir (Şekil 3B).

2017-2018 sezonuna ait virüslerin dört farklı klada dağıldığı ve beş ülkedeki (Yunanistan, Ermenistan, Gürcistan, İran ve Ukrayna) virüslerle genetik olarak yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 3A, 3B, 3D ve 3E). 2016-2017 sezonuna ait virüsler üç ülkedeki (İran, Yunanistan ve Ukrayna) virüslerle genetik yakınlık göstermiştir (Şekil 3E ve 3F). Yine aynı sezonda Türkiye'de dolaşımında olan bir virüs, 2017-2018 sezonunda yine Türkiye'de dolaşımında olan bir virüs ile aynı kladda yer alırken, geriye kalan altı virüs



Şekil 3. Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımında olan Yamagata soyuna ait virüslerin HA genlerine göre filogenetik ilişkileri. Çalışma kapsamındaki influenza B virüslerinin HA genleri GISAID veri tabanından indirilmiş ve maksimum olabirlik (maximum likelihood) yöntemi ile filogenetik analize tabi tutulmuştur. Analiz, IQ-TREE arayüzünde, UFBoot kullanılarak ve ModelFinder ile en uygun model seçilerek (K3Pu+F+G4) gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç ITOL kullanılarak görselleştirilmiştir. Türkiye'de saptanan her bir Yamagata soyuna ait virüs kutucukları içerisinde detaylıca gösterilmiştir (A-H). 2018-2019 sezonu için açık mavi (B), 2017-2018 sezonu için mor (A, B, D, E), 2016-2017 sezonu için açık yeşil (E, F), 2014-2015 sezonu için turuncu (C, F), 2013-2014 sezonu için koyu yeşil (C, G, H), 2011-2012 sezonu için kırmızı (H) ve 2010-2011 sezonu için koyu mavi (H) daireler virüs isimlerinin önlerine eklenmiştir. Her bir sezon için renk açıklaması şeklin sol üst bölümünde verilmiştir. Bootstrap değeri %50'nin üstünde olan dallar analiz kapsamında tutulmuş ve her bir dala ait bootstrap değeri dalların yanına eklenmiştir. Bootstrap değeri %50'nin altında kalan dallar ise analizin güvenilirliğini artırmak amacıyla ağaçtan çıkarılmıştır. Filogenetik ağacın altında belirtilen ölçek, 0.005 nükleotid değişimi olan mesafeyi temsil etmektedir.



2014-2015 sezonundaki virüslerle genetik olarak yakın bulunmuştur (Şekil 3E ve 3F). 2014-2015 sezonunda saptanan diğer beş virüs ise 2013-2014 sezonundaki virüslerle genetik benzerlik göstermiş ve Yunanistan, İran, Ukrayna ve Bulgaristan'daki virüslerle aynı kladda konumlanmıştır (Şekil 3C). Benzer bir durum 2010-2011, 2011-2012 ve 2013-2014 sezonlarında da gözlemlenmiştir (Şekil 3G ve 3H). 2013-2014 sezonundaki üç virüs ayrı bir kladda yer alarak Ukrayna'daki virüsler ile genetik benzerlik göstermiştir (Şekil 3G). Geriye kalan bir virüs ise 2010-2011 ve 2011-2012 sezonlarında dolaşımda olan virüsler ile aynı kladda yer alarak bu sezonlarda olduğu gibi Yunanistan ve İran'daki virüsler ile genetik yakınlık göstermiştir (Şekil 3H). Filogenetik analizler sonucu, 2010-2024 yılları arasında Türkiye'de farklı sezonlarda dolaşımda olan Victoria ve Yamagata soylarına ait influenza B virüslerinin genetik açıdan en benzerlik gösterdiği virüslerin dolaşımda olduğu ülkeler Tablo 2'de özetlenmiştir.

**Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımda olan influenza B virüslerinin HA proteinlerindeki antijenik değişimler ve sezonlara göre antijenik uzaklıkları:** Türkiye'de dolaşımda olan influenza B virüslerinin HA genlerine dayalı filogenetik yakınlıklarının belirlenmesinin ardından, çalışma grubundaki HA genlerinin nükleotid dizileri amino asit dizilerine çevrilmiş ve her bir sezon için antijenik

bölgelerde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Bu değişikliklerin frekansları belirlenmiş ve sezonlar arası dinamikleri izlenmiştir.

Çalışma grubundaki Victoria soyuna ait virüslerin, 10 sezonda dolaşımda olduğu ve bu sezonlarda Yamagata soyuna kıyasla HA proteinlerinde daha fazla antijenik değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4). Toplamda 23 farklı antijenik pozisyonda değişim gözlemlenmiş, bunlardan 12 pozisyonda gözlemlenen değişiklikler birden fazla sezonda ortaya çıkmıştır (Şekil 4A). Geriye kalan 11 antijenik değişim ise sadece bir sezonda ve düşük frekansta gözlemlenmiştir (Şekil 4A, Tablo 3). Bununla birlikte, bazı pozisyonlarda (118, 122, 129, 170 ve 199) antijenik değişimler birden fazla sezonda gözlemlenmiş olmasına rağmen, baskın amino asitlerin sezonlar arasında değişmediği belirlenmiştir (Şekil 4A, Tablo 3). Sezonlar arası baskın amino asidin değiştiği yedi pozisyon ise daha derinlemesine incelenmiştir. 117. pozisyonda 2010-2011 sezonunda izolösünün (I) baskın olduğu gözlemlenirken, 2015-2016 sezonunda valin (V) baskın hale gelmiş ve bu değişim 2016-2017 sezonunda da devam etmiştir (Şekil 4A). Benzer şekilde, 128. pozisyonda 2019-2020 sezonunda baskın amino asit olan lizin (K), 2022-2023 sezonunda glutamik asit (E) haline gelmiş, ardından 2023-2024 sezonunda tekrar K baskın hale geçmiştir (Şekil 4A). 2018-2019 sezonunda 133. pozisyonda eşit oranda glisin (G) ve arjinin (R)

**Tablo 2. HA genlerinin filogenetik analizlerine göre farklı sezonlarda Türkiye'de dolaşımda olan Victoria ve Yamagata soyuna ait virüslerin genetik olarak benzer olduğu virüslerin görüldüğü ülkeler**

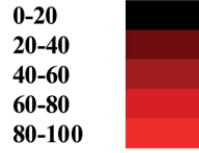
Sezon	Ülkeler	
	Victoria	Yamagata
2023-2024	Bulgaristan, Ukrayna	N/A
2019-2020	İran, Gürcistan, Yunanistan, Bulgaristan, Ukrayna, Ermenistan	N/A
2018-2019	Bulgaristan	Ukrayna
2017-2018	Bulgaristan	Yunanistan, Ermenistan, Gürcistan, İran, Ukrayna
2016-2017	Ukrayna, Ermenistan, Gürcistan, Bulgaristan, Yunanistan, İran	İran, Yunanistan, Ukrayna
2015-2016	Ukrayna, Ermenistan, Gürcistan, Bulgaristan, Yunanistan, İran	N/A
2014-2015	N/A	Ukrayna, Bulgaristan, İran, Yunanistan
2013-2014	Yunanistan	Ukrayna, Yunanistan, İran
2011-2012	N/A	Yunanistan, İran
2010-2011	Ukrayna, Bulgaristan, Gürcistan	Yunanistan, İran

Herhangi bir HA gen dizisi bulunmayan sezonlar N/A şeklinde belirtilmiştir.

**A**

	117	I	V	
2010-2011	122	H	N	
	197	N	S	
	199	T	N	
	2011-2012	144	P	L
2012-2013	199	T	I	
2015-2016	117	V	I	
	202	A	T	
2016-2017	117	V	I	
	118	R	S	
	129	D	G	
	145	N	D	
	162	K	DEL	
	163	N	T	DEL
2017-2018	197	N	S	
	118	R	K	
	129	D	G	
	162	K	DEL	
	163	N	DEL	
	164	D	E	
2018-2019	197	N	T	
	199	T	I	
	129	D	G	
	133	G	R	
	136	K	E	
	162	DEL	K	
2019-2020	163	DEL	N	
	164	DEL	D	
	127	A	T	
	128	K	E	
	129	D	N	
	133	R	G	
2022-2023	149	G	E	
	170	T	I	
	128	E	K	
	129	D	G	
	137	I	V	
	146	I	T	
2023-2024	162	DEL	K	
	163	DEL	N	
	164	DEL	D	
	165	K	N	
	170	T	I	
	197	E	D	N
2023-2024	122	H	N	
	128	K	E	G
	129	D	N	
	169	A	T	
	197	E	D	
	199	T	A	
201	M	V		

Frekans (%)



**B**

2010-2011	201	K	R	
2011-2012	150	I	S	
	165	Y	N	
2012-2013	121	T	S	A
	122	Q	K	
	141	G	R	
	150	S	I	
	163	D	N	
	164	N	S	
2013-2014	165	N	Y	
	116	K	N	
	120	S	L	
	121	T	S	
	123	N	T	
	150	I	S	
2014-2015	165	Y	N	
	198	T	N	
	202	S	N	
	116	K	R	
2017-2018	202	S	N	
	124	V	L	
	136	R	K	
2018-2019	163	D	E	
	164	N	D	
	165	Y	N	
2018-2019	120	S	T	

Şekil 4. Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımda olan influenza B virüslerinin HA proteinlerindeki antijenik değişiklikler. 2010-2024 yılları arasında dolaşımda olan Victoria (A) ve Yamagata (B) soylarına ait influenza B virüslerinin HA proteinlerinde gözlemlenen antijenik değişiklikler, frekanslar baz alınarak renk skalasıyla (%0-100: siyahtan açık kırmızıya) gösterilmiştir. Antijenik değişimlerin gözlemlendiği sezonlar ve amino asit pozisyonları, panellerin sol tarafında listelenmiştir. Her iki soy için de HA proteinlerinin numaralandırılması, sinyal peptidi (1-15. pozisyonlar) çıkarıldıktan sonra başlamaktadır. Amino asit silinmeleri "DEL" ile belirtilmiştir.

**Tablo 3. Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımda olan influenza B virüslerinin HA proteinlerindeki antijenik değişiklikler ve bu değişikliklerin frekansları**

Sezon	Amino Asit Pozisyonları, Varyasyonları ve Frekansları (%)	
	Victoria	Yamagata
2010-2011	117: I (96,55), V (3,45) 122: H (96,55), N (3,45) 197: N (93,10), S (6,90) 199: T (96,55), N (3,45)	201: K (90,00), R (10,00)
2011-2012	144: P (81,82), L (18,18)	150: I (50), S (50) 165: Y (50), N (50)
2012-2013	199: T (75), I (25)	121: T (80,56), S (16,67), A (2,78) 122: Q (77,78), K (22,22) 141: G (97,22), R (2,78) 150: S (75), I (25) 163: D (97,22), N (2,78) 164: N (97,22), S (2,78) 165: N (75), Y (25)
2013-2014	N/A	116: K (76,47), N (23,53) 120: S (94,12), L (5,88) 121: T (82,35), S (17,65) 123: N (94,12), T (5,88) 150: I (82,35), S (17,65) 165: Y (82,35), N (17,65) 198: T (94,12), N (5,88) 202: S (76,47), N (23,53)
2014-2015	N/A	116: K (98,15), R (1,85) 202: S (99,07), N (0,93)
2015-2016	117: V (95,74), I (4,26) 202: A (97,87), T (2,13)	N/A
2016-2017	117: V (96,67), I (3,33) 118: R (98,89), S (1,11) 129: D (98,89), G (1,11) 145: N (97,78), D (2,22) 162: K (98,89), DEL (1,11) 163: N (97,78), T (1,11), DEL (1,11) 197: N (98,89), S (1,11)	N/A
2017-2018	118: R (94), K (6) 129: D (90), G (10) 162: K (90), DEL (10) 163: N (90), DEL (10) 164: D (98), E (2) 197: N (98), T (2) 199: T (98), I (2)	124: V (99,21), L (0,79) 136: R (99,21), K (0,79) 163: D (98,43), E (1,57) 164: N (99,21), D (0,79) 165: Y (99,21), N (0,79)
2018-2019	129: D (75), G (25) 133: G (50), R (50) 136: K (50), E (50) 162: DEL (75), K (25) 163: DEL (75), N (25) 164: DEL (50), D (50)	120: S (92,31), T (7,69)
2019-2020	127: A (97,92), T (2,08) 128: K (52,08), E (47,92) 129: D (91,67), N (8,33) 133: R (97,92), G (2,08) 149: G (97,92), E (2,08) 170: T (97,92), I (2,08)	N/A

Herhangi bir HA gen dizisi/antijenik değişim bulunmayan sezonlar N/A şeklinde belirtilmiştir. Amino asit silinmeleri "DEL" ile gösterilmiştir.

Tablo 3. Devamı

Amino Asit Pozisyonları, Varyasyonları ve Frekansları (%)		
Sezon	Victoria	Yamagata
2022-2023	128: E (71,15), K (28,85) 129: D (88,46), G (11,54) 137: I (98,08), V (1,92) 146: I (94,23), T (5,77) 162: DEL (92,31), K (7,69) 163: DEL (92,31), N (7,69) 164: DEL (92,31), D (7,69) 165: K (92,31), N (7,69) 170: T (96,15), I (3,85) 197: E (73,08), D (23,08), N (3,85)	N/A
2023-2024	122: H (86,67), N (13,33) 128: K (51,11), E (26,67), G (22,22) 129: D (75,56), N (24,44) 169: A (97,78), T (2,22) 197: E (86,67), D (13,33) 199: T (88,89), A (11,11) 201: M (97,78), V (2,22)	N/A

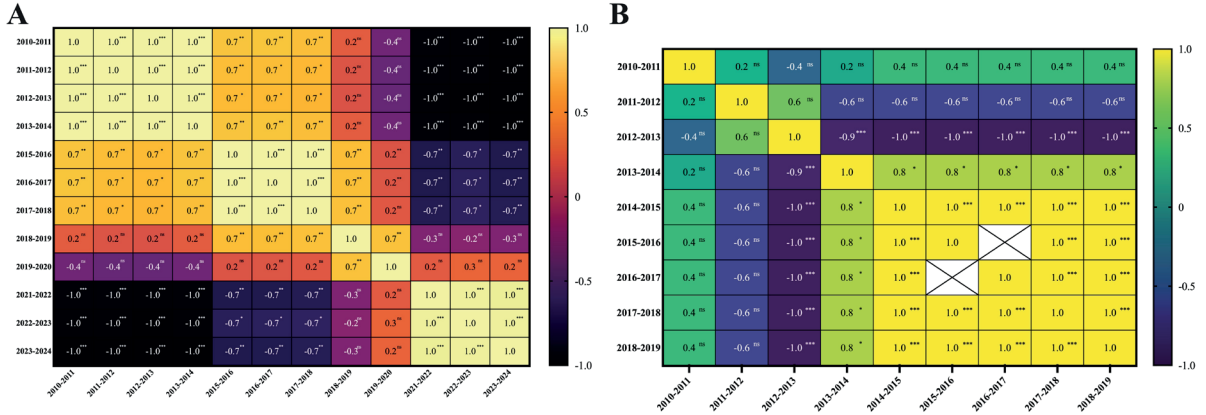
Herhangi bir HA gen dizisi/antijenik değişim bulunmayan sezonlar N/A şeklinde belirtilmiştir. Amino asit silinmeleri "DEL" ile gösterilmiştir.

amino asitleri gözlemlenmiş, 2019-2020 sezonunda ise bu pozisyonda R baskın hale gelmiştir (Şekil 4A). 2016-2017 sezonundan itibaren 162., 163. ve 164. pozisyonlarda silinmeler tespit edilmiştir (Şekil 4A). Bu sezonda düşük frekansta başlayan 162. ve 163. pozisyonlardaki silinmeler, 2018-2019 sezonunda baskın hale gelmiştir (Şekil 4A, Tablo 3). Aynı zamanda, 164. pozisyonundaki silinmenin 2018-2019 sezonunda aspartik asit (D) ile aynı frekansa ulaştığı ve sonraki sezonlarda baskın hale geldiği belirlenmiştir (Şekil 4A, Tablo 3). Son olarak, 197. pozisyonda 2010-2011, 2016-2017 ve 2017-2018 sezonlarında baskın olan asparajin (N) amino asidinin, 2022-2023 sezonunda E ile yer değiştirdiği ve bu değişimin 2023-2024 sezonunda da devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4A).

Yamagata soyuna ait virüslerin yedi farklı sezonda dolaşımda olduğu ve HA proteinlerinde toplam 15 pozisyonda antijenik değişim olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4B). Bu değişikliklerden yedisi sadece bir sezonda ve düşük frekansta gözlemlenmiştir (Şekil 4B, Tablo 3). Kalan pozisyonların altısında (116, 120, 121, 163, 164 ve 202) antijenik değişimler gözlemlenmiş olmasına rağmen baskın amino asitlerin değişmediği saptanmıştır (Şekil 4B). Geriye kalan iki pozisyonundaki

değişimler ise daha derinlemesine incelenmiştir. 150. pozisyonda 2011-2012 sezonunda I ve serin (S) amino asitleri eşit oranlarda gözlemlenirken, 2012-2013 sezonunda S, 2013-2014 sezonunda ise I baskın hale gelmiştir (Şekil 4B). Benzer bir durum 165. pozisyonda da gözlemlenmiştir; 2011-2012 sezonunda tirozin (Y) ve N eşit oranda bulunurken, 2012-2013 sezonunda N, 2013-2014 sezonunda ise Y baskın hale gelmiştir (Şekil 4B).

Çalışma grubundaki influenza B virüslerinin HA proteinlerinin antijenik bölgelerindeki değişimler saptandıktan sonra, bu virüslerin sezonlar arası antijenik uzaklıkları belirlenmiş ve Pearson korelasyon katsayıları hesaplanarak istatistiksel anlamlılıkları değerlendirilmiştir. Pearson katsayısı hesaplamaları, iki değişken arasındaki doğrusal ilişkiyi ölçmek için kullanılmıştır. Pearson korelasyon katsayısının -1 olması iki değişken arasında negatif doğrusal bir ilişki olduğunu gösterirken 1 olması iki değişken arasında pozitif doğrusal bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, farklı sezonlara ait virüsler arasındaki antijenik uzaklıklar renk skalası kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 5). Koyu renkler antijenik farklılığı, açık renkler ise antijenik benzerliği temsil etmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Türkiye ve komşu ülkelerde dolaşımda olan influenza B virüslerinin antijenik bölgelerine göre sezonlar arası uzaklık matrisleri. Victoria (A) ve Yamagata (B) soylarına ait virüslerin sezonlar arası antijenik uzaklıkları, Needleman-Wunsch algoritması kullanılarak hesaplanmıştır. Bir sezonda saptanan antijenik değişikliklerin ortalama değeri, diğer sezonlardaki değişikliklerin ortalama değeri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, toplam antijenik pozisyon sayısına göre normalize edilmiş ve Pearson korelasyon katsayıları hesaplanarak istatistiksel anlamlılıkları değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık dereceleri, p-değerlerine göre şu şekilde sınıflandırılmıştır: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan (p>0.05) değerler ise ns ile gösterilmiştir. Tüm sezonlar birbirleriyle karşılaştırılmış olup, sezon adları matrislerin altında ve yanında belirtilmiştir. Koyu renkler antijenik uzaklığı, açık renkler ise antijenik benzerliği temsil etmektedir. Yamagata soyuna ait analizlerde (B), 2015-2016 ve 2016-2017 sezonları arasında herhangi bir antijenik değişim gözlenmediğinden, bu sezonlar arasındaki antijenik uzaklıklar uygulama tarafından otomatik olarak boş bırakılmıştır.

Victoria soyuna ait virüslerin, 2010-2011 ve 2023-2024 sezonları arasında antijenik bölgelerindeki uzaklıkların kademeli olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 5A). Victoria soyuna ait virüslerin 2010-2014 (p<0.001), 2015-2018 (p<0.001), 2018-2020 (p<0.01) ve 2021-2024 (p<0.001) yılları arasında antijenik açıdan büyük oranda benzer olduğu, öte yandan 2010-2011 sezonu ile 2023-2024 sezonu arasında dikkat çekici bir antijenik farklılık olduğu tespit edilmiştir (p<0.001) (Şekil 5A). Özellikle 2015-2016 sezonuna kadar olan dönemlerde virüslerin birbirlerine oldukça yakın antijenik yapıda olduğu (p<0.01) ve bazı sezonlar için istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, 2010-2011 sezonuna kıyasla 2015-2016 sezonundan sonra antijenik çeşitliliğin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 5A). 2023-2024 sezonuna doğru antijenik uzaklıkların daha belirgin hale geldiği ve virüslerin önceki sezonlardan önemli ölçüde farklılaştığı görülmüştür (Şekil 5A).

Yamagata soyuna ait virüslerde ise 2010-2011 ve 2018-2019 sezonları arasında antijenik uzaklıkların kademeli olarak artmadığı, yalnızca belirli sezonlar arasında kayda değer değişiklikler olduğu saptanmıştır (Şekil 5B). Yapılan analizler, genel olarak sezonlar arasında daha az çeşitlilik bulunduğunu ve

antijenik uzaklığın Victoria soyuna kıyasla daha sabit kaldığını göstermektedir (Şekil 5B). Ancak, 2012-2013 sezonu ile takip eden sezonlar arası istatistiksel olarak anlamlı belirgin farklılaşmalar gözlemlenmiştir (p<0.001) (Şekil 5B). Buna karşılık, 2014-2019 yılları arasındaki virüslerin antijenik benzerliklerinin daha yüksek olması, Yamagata soyuna ait virüslerin antijenik değişim açısından daha stabil bir yapıda olduğunu göstermiştir (Şekil 5B). Yamagata soyuna yönelik yapılan analizlerde, 2015-2016 ve 2016-2017 sezonları arasında herhangi bir antijenik değişiklik saptanmadığından, bu iki sezon arasındaki antijenik uzaklıklar grafik üzerinde uygulama tarafından otomatik olarak boş bırakılmıştır (Şekil 5B).

## TARTIŞMA

İnfluenza virüsleri, her yıl mevsimsel enfeksiyonlara yol açarak dünya genelinde bir milyona yakın insanı etkilemektedir<sup>(1)</sup>. Hastalığın etkisini azaltmada en etkili yöntem ise aşı olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve yetkili kurumlar tarafından rutin sürveyans çalışmaları yürütülmekte, virüs genomlarında özellikle aşı bileşeni olarak kullanılan ve antijenik açıdan en önemli bölge olan HA genindeki değişiklikler yakından izlenmektedir. Bu

süreç sonucunda, DSÖ'nün önerileri doğrultusunda üçlü (trivalan) ya da dörtlü (quadriyalan) aşılar oluşturulmaktadır. Trivalan aşilar, iki influenza A alt tipi ve bir influenza B soyunu içerirken, quadriyalan aşilar her iki influenza B soyunu da dahil ederek daha geniş bir koruma sağlamaktadır. COVID-19 pandemisi sonrasında Yamagata soyuna ait virüslerin viral popülasyondan silinme olasılığı, bu soyun aşılarda yer alıp almaması konusundaki tartışmaları beraberinde getirmiş ve bu virüslerin araştırılmasının önemini daha da artırmıştır<sup>(7-8)</sup>. Bu sebeple çalışma kapsamında, GISAID veri tabanındaki HA gen dizileri ve demografik bilgiler kullanılarak 1) 2010-2024 yılları arasında Türkiye'de dolaşımda olan Victoria ve Yamagata soyuna ait virüslerin komşu ülkelerdeki virüslerle filogenetik yakınlıkları, 2) Victoria ve Yamagata soyuna ait virüslerin HA proteinlerindeki antijenik bölgelerde meydana gelen amino asit değişiklikleri ve sezonlar arası farklılıkları ve 3) yaş faktörünün virüslerin epidemiyolojisi üzerindeki potansiyel etkisi incelenmiştir. Bu sayede, bu çalışmanın ileride yapılacak ve influenza B virüslerinin epidemiyolojik özelliklerini daha kapsamlı inceleyecek prospektif ve deneysel çalışmalar için bir temel oluşturması amaçlanmıştır.

İlk olarak GISAID veri tabanından Türkiye ve komşu ülkelerde (Yunanistan, Bulgaristan, Gürcistan, Ermenistan, İran ve Suriye) dolaşımda olan influenza B virüslerine ait HA gen dizileri soylara göre filtrelenerek indirilmiştir. Ülkenin kuzeyini temsil etmesi amacıyla, sınır komşusu olmasa da Ukrayna'dan elde edilen HA gen dizileri de analizlerde yer almıştır. Türkiye'nin sınır komşusu olan Irak'ta her iki soydan, Suriye'de ise Yamagata soyundan yeterli sayıda HA gen dizisi bulunmadığından, bu ülkeler ilgili analizlere dahil edilememiştir. Veri tabanındaki HA gen dizilerinin büyük çoğunluğunu Victoria soyuna ait virüslerin oluşturduğu gözlemlenmiştir (Tablo 1). Bunun yanı sıra, ülkeler arasında veri tabanına yüklenen dizi sayısında da belirgin farklılıklar mevcuttur. Örneğin, veri tabanına en fazla HA gen dizisinin yüklendiği ülke olan Ukrayna ile ikinci sırada yer alan Türkiye arasında üç kattan daha fazla fark bulunurken, en az diziye sahip Suriye ile bu fark neredeyse 26 kata ulaşmaktadır (Tablo 1). Bu sayısal farklılıkların, özellikle daha az gen dizisine sahip Yamagata

soyundan virüslerin antijenik özelliklerinin tam olarak anlaşılmasına ve/veya analizlerde bazı ülkelerin baskın duruma geçmesine neden olarak çalışmanın sonuçlarını sınırlayabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, veri tabanında yer alan demografik bilgilere göre, ülkeler arasında farklılıklar bulunsa da genel olarak Victoria soyuna ait virüslerin 0-18 yaş arası çocuk ve gençlerde, Yamagata soyuna ait virüslerin ise 19 yaş üstü yetişkinlerde çoğunluğu oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). Çocuk ve gençlerde sık görülen Victoria soyuna ait virüslerin kıtalar arası yayılımının, yetişkinlerin virüs yayılımında daha aktif rol oynaması sebebiyle kısıtlanabileceği öne sürülmüştür<sup>(13)</sup>. Ancak, bu çalışma daha sınırlı bir coğrafi alanı incelemiş ve Victoria soyuna ait virüslerin yakın coğrafyalara yayılımda daha başarılı olabileceğini göstermiştir.

Viral popülasyonların şekillenmesinde ve virüslerin yayılımında ticaret yolları, uluslararası seyahat, göç ve popülasyon hareketliliği gibi birçok faktör rol almaktadır. Ancak bu çalışmada, çalışma grubu olarak Türkiye ve komşu ülkelerdeki virüsler seçilerek bu virüslerin sadece genetik ve filogenetik ilişkilerine odaklanılmıştır. Böylece, bölgesel virüs dinamikleri incelenerek uzak coğrafyalardaki virüslerin bu dinamiklere olan etkileri çalışma kapsamına alınmamıştır. Filogenetik analizlerin sonuçlarına göre, Türkiye'de dolaşımda olan influenza B virüsleri, farklı sezonlarda çeşitli ülkelerdeki virüslerle genetik benzerlik göstermiştir (Şekil 2, Şekil 3, Tablo 2). Ancak, bu durum farklı soyların farklı sezonlarda görüldüğü ülke sayıları açısından çeşitlilik göstermektedir. Bununla birlikte, Victoria soyunda sezonlar arası genetik farklılıklar daha belirgin iken, Yamagata soyunda bu farklılıklar daha sınırlı kalmıştır. Elde edilen veriler, Türkiye'deki Victoria soyuna ait virüslerin birçok sezonda birçok ülkedeki virüslerle genetik açıdan benzer olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle üç sezonda (2019-2020, 2016-2017 ve 2015-2016) görülen Victoria soyuna ait virüslerin, altı farklı ülkedeki virüslerle genetik olarak benzer olması, bu sezonlara ait virüslerin yakın coğrafyalarda daha etkin bir yayılım sergilediğini göstermiştir (Şekil 2, Tablo 2). Buna karşılık, Türkiye'de dolaşımda olan Yamagata soyuna ait virüsler, yalnızca 2017-2018 sezonunda beş farklı ülkede dolaşımda olan

virüslerle genetik benzerlik göstermiş ve bu durum, Yamagata soyundaki virüslerin yayılımının daha sınırlı olduğuna işaret etmiştir (Şekil 3, Tablo 2). Bu bulgular, Türkiye'deki Victoria soyuna ait virüslerin daha fazla ülkede dolaşım gösteren virüslerle genetik benzerliğe sahip olduğunu ve aynı sezon içinde yakın coğrafyalarda daha esnek bir yayılım sergilediğini göstermiştir.

Yamagata soyuna ait virüslerin, yakın coğrafyalardaki ülkeler arası yayılım açısından dezavantajlı olması ve COVID-19 pandemisi sonrası popülasyondan silinme ihtimalleri, bu virüslerin evrimsel süreçlerinde bir dar boğaza girmiş olabileceklerine işaret etmektedir. Bu görüşü destekler nitelikte, Victoria soyuna ait virüslerin HA proteininde daha sık ve dinamik antijenik değişimler yaşanırken, Yamagata soyunun daha stabil bir antijenik yapıya sahip olduğu ve sezonlar arası antijenik benzerliklerinin yüksek oranda korunduğu belirlenmiştir (Şekil 5). Victoria soyuna ait virüslerin 2010-2014, 2015-2018, 2018-2020 ve 2021-2024 yılları arasında antijenik açıdan genel olarak benzer olduğu, ancak 2010-2011 sezonu ile 2023-2024 sezonu arasında belirgin bir antijenik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5A). Öte yandan, Yamagata soyundaki virüslerde sadece 2012-2013 sezonu ile takip eden sezonlar arasında belirgin farklılıklar gözlemlenmiş ve 2014-2019 yılları arasındaki virüslerin antijenik açıdan oldukça yakın oldukları belirlenmiştir (Şekil 5B). İlk olarak, pandemi döneminde uygulanan maske kullanımı, sosyal mesafe ve seyahat kısıtlamaları gibi önlemlerin, Yamagata soyunu daha fazla etkilemiş olabileceği akla gelmiştir. Ancak, GISAID veri tabanındaki verilere bakıldığında, Yamagata soyuna ait virüslerin en fazla dizi sayısına 2017-2018 sezonunda ulaştığı, fakat yalnızca bir sezon sonra dizi sayısında belirgin bir düşüş yaşandığı gözlemlenmiştir (Tablo 1). Bu bulgular, Yamagata soyuna ait virüslerin sınırlı yayılımı ve stabil antijenik yapıları nedeniyle oluşan dar boğazın pandemi sürecinde daha da hızlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, Victoria soyuna ait virüslerin pandemiye rağmen daha yüksek başarı göstermesi, bu soyda görülen antijenik değişimlerin evrimsel avantaj sağladığı şeklinde yorumlanmıştır.

Victoria soyunda gözlemlenen amino asit değişiklikleri ve glikozilasyon bölgelerinin kaybı gibi yapısal farklılıklar, influenza virüslerinin antijenik evriminde önemli bir rol oynamaktadır<sup>(41)</sup>. Çalışmamızda, sezonlar arasında dikkat çeken dört önemli amino asit değişikliği tespit edilmiştir (Şekil 4). 2015-2017 sezonlarında görülen I117V ve 2020-2021 sezonlarında tespit edilen E128K ile G133R amino asit değişimlerinin birçok ülkede yaygın olduğu gözlemlenmiştir<sup>(42-46)</sup>. Bu değişimlerin işlevleri tam olarak bilinmese de, influenza B virüslerinin farklı antijenik kladlara yerleşmesine katkı sağlamışlardır<sup>(42-46)</sup>. Ayrıca, N197E değişikliği, virüsün virülansını ve antijenitesini etkileyen önemli bir olay olan glikozilasyon bölgesi kaybına neden olmuştur<sup>(44)</sup>. Özellikle 2016-2017 sezonunda görülmeye başlayıp 2018-2019 sezonunda baskın hale gelen 162., 163. ve 164. pozisyonlardaki silinmelerin (Şekil 4), Victoria soyunun antijenik yapısını değiştirerek aşılama sonrası elde edilen antikorların çapraz reaktivitesinde düşüşe yol açtığı bildirilmiştir<sup>(18)</sup>. Buna karşılık, Yamagata soyunda sezonlar arası sadece 150. ve 165. pozisyonlarda dikkat çekici değişiklikler gözlemlenmiştir (Şekil 4). Bu pozisyonlarda görülen varyasyonlar farklı ülkelerde görülse de işlevleri tam olarak açıklanamamıştır<sup>(13,47)</sup>. 2018-2019 sezonunda, Victoria soyundaki virüslerin HA proteininde 162., 163. ve 164. pozisyonlardaki amino asit silinmelerinin baskın hale gelmesi ve Yamagata soyuna ait virüs sayısının belirgin şekilde azalması dikkat çekici bir bulgu olarak öne çıkmıştır. Bu silinmelerin influenza B virüslerinin evrimsel dinamiklerine beklenenden daha fazla katkı sağlayabileceği düşünülmekte, ancak bu hipotezin doğrulanması için ek *in silico*, *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

GISAID veri tabanındaki sınırlı verilere dayanarak gerçekleştirilen bu çalışma, Türkiye'de dolaşımda olan Victoria ve Yamagata soylarına ait influenza B virüslerinin HA genlerinde farklı evrimsel dinamikler sergilediğini ortaya koymuştur. Literatürde, yaş faktörünün uzak coğrafyalarda virüs yayılımında etkili olabileceği belirtilse de bu çalışmanın sonuçları, yaş faktörünün yakın coğrafyalardaki virüs yayılımında daha az etkili olabileceğini göstermiştir. Yamagata soyuna ait virüslerin coğrafi yayılımlarının sınırlı kalması ve viral popülasyondan kaybolma sürecinde,





4. Naquin A, O'Halloran A, Ujamaa D, et al. laboratory-confirmed influenza-associated hospitalizations among children and adults - Influenza Hospitalization Surveillance Network, United States, 2010-2023. *MMWR CDC Surveill Summ.* 2024;73(6):1-18. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7706a1>
5. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008;26(Suppl 4):D49-53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
6. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology.* 1990;175(1):59-68. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90186-U](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90186-U)
7. Paget J, Caini S, Del Riccio M, van Waarden W, Meijer A. Has influenza B/Yamagata become extinct and what implications might this have for quadrivalent influenza vaccines? *Euro Surveill.* 2022;27(39):2200753. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.39.2200753>
8. Caini S, Meijer A, Nunes MC, et al. Probable extinction of influenza B/Yamagata and its public health implications: a systematic literature review and assessment of global surveillance databases. *Lancet Microbe.* 2024;5(8):100851. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00066-1)
9. Coudeville L, Bailleux F, Riche B, Megas F, Andre P, Ecochard R. Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: Development and application of a bayesian random-effects model. *BMC Med Res Methodol.* 2010;10:18. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-10-18>
10. Wang Q, Cheng F, Lu M, Tian X, Ma J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J Virol.* 2008;82(6):3011-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02477-07>
11. Krystal M, Young JF, Palese P, Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Sequential mutations in hemagglutinins of influenza B virus isolates: definition of antigenic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(14):4527-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4527>
12. Sun W, Kang DS, Zheng A, et al. Antibody responses toward the major antigenic sites of influenza B virus hemagglutinin in mice, ferrets, and humans. *J Virol.* 2019;93(2):e01673-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01673-18>
13. Virk RK, Jayakumar J, Mendenhall IH, et al. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(1):619-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916585116>
14. Blanton L, Alabi N, Mustaqim D, et al. Update: Influenza activity in the United States during the 2016–17 season and composition of the 2017–18 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66(25):668-76. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6625a3>
15. Shu B, Kirby MK, Warnes C, et al. Detection and discrimination of influenza B Victoria lineage deletion variant viruses by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(41):1900652. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.41.1900652>
16. Korsun N, Trifonova I, Voleva S, Grigorova I, Angelova S. Genetic characterisation of the influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2019-2020 winter season. *Virus Genes.* 2021;57(5):401-12. <https://doi.org/10.1007/s11262-021-01853-w>
17. World Health Organization (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2024 southern hemisphere influenza season. 2023. [[https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphere-recommendation-2024/202309\\_recommendation.pdf](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphere-recommendation-2024/202309_recommendation.pdf)] (Erişim tarihi: 1.Ekim.2024).
18. Xie H, Xiang R, Wan HJ, et al. Reduced influenza B-specific postvaccination antibody cross-reactivity in the B/Victoria lineage-predominant 2019/20 Season. *Clin Infect Dis.* 2021;72(11):e776-83. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1481>
19. Peltola V, Ziegler T, Ruuskanen O. Influenza A and B virus infections in children. *Clin Infect Dis.* 2003;36(3):299-305. <https://doi.org/10.1086/345909>
20. Bedford T, Riley S, Barr IG, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature.* 2015;523(7559):217-20. <https://doi.org/10.1038/nature14460>
21. Avni T, Babich T, Nir A, et al. Comparison of clinical outcomes of influenza A and B at the 2017–2018 influenza season: a cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(6):1109-14. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03822-x>
22. Xu C, Chan KH, Tsang TK, et al. Comparative epidemiology of influenza B Yamagata- and Victoria-Lineage viruses in households. *Am J Epidemiol.* 2015;182(8):705-13. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv110>
23. World Health Organization (WHO). Influenza (Seasonal). 2023. [[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))] (Erişim tarihi: 18.Kasım.2024).

24. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE Team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
25. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015;32(1):268-74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
26. Hoang DT, Chernomor O, Von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol Biol Evol*. 2018;35(2):518-22. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
27. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TK, Von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017;14(6):587-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
28. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W293-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
29. Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*. 1970;48(3):443-53. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90057-4)
30. Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*. 2004;305(5682):371-6. <https://doi.org/10.1126/science.1097211>
31. de Jong JC, Smith DJ, Lapedes AS, et al. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol*. 2007;81(8):4315-22. <https://doi.org/10.1128/JVI.02458-06>
32. Neher RA, Bedford T, Daniels RS, Russell CA, Shraiman BI. Prediction, dynamics, and visualization of antigenic phenotypes of seasonal influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(12):E1701-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525578113>
33. Pan K, Subieta KC, Deem MW. A novel sequence-based antigenic distance measure for H1N1, with application to vaccine effectiveness and the selection of vaccine strains. *Protein Eng Des Sel*. 2011;24(3):291-9. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq105>
34. Lin Q, Ji X, Wu F, Ma L. Conserved sequence analysis of influenza A virus ha segment and its application in rapid typing. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(8):1328. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081328>
35. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Webster RG. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol*. 1990;64(4):1487-97. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.4.1487-1497.1990>
36. Hu YJ, Chow KC, Liu CC, Lin LJ, Wang SC, Wang SD. Using combinatorial bioinformatics methods to analyze annual perspective changes of influenza viruses and to accelerate development of effective vaccines. *J Formos Med Assoc*. 2015;114(8):774-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.03.018>
37. Anderson CS, McCall PR, Stern HA, Yang H, Topham DJ. Antigenic cartography of H1N1 influenza viruses using sequence-based antigenic distance calculation. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(1):51. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2042-4>
38. Anderson CS, Sangster MY, Yang H, Mariani TJ, Chaudhury S, Topham DJ. Implementing sequence-based antigenic distance calculation into immunological shape space model. *BMC Bioinformatics*. 2020;21(1):256. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03594-3>
39. Cristianini N and Hahn MW. Introduction to Computational Genomics: A Case Studies Approach. United States of America: Cambridge University Press; 2006.
40. Han J, Kamber M, Pei J. Data Mining: Concepts and Techniques. 3rd ed. United States of America: Morgan Kaufmann Publishers is an imprint of Elsevier; 2012.
41. York IA, Stevens J, Alymova IV. Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Biosci Rep*. 2019;39(1):BSR20171505. <https://doi.org/10.1042/BSR20171505>
42. Wang X, Kim KW, Walker G, Stelzer-Braid S, Scotch M, Rawlinson WD. Genome characterization of influenza A and B viruses in New South Wales, Australia, in 2019: A retrospective study using high-throughput whole genome sequencing. *Influenza Other Respir Viruses*. 2024;18(1):e13252. <https://doi.org/10.1111/irv.13252>
43. Puzelli S, Di Martino A, Facchini M, et al. Co-circulation of the two influenza B lineages during 13 consecutive influenza surveillance seasons in Italy, 2004-2017. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):990. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4621-z>
44. World Health Organization (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2021- 2022 northern hemisphere influenza season. 2021. [[https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/202102\\_recommendation.pdf](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/202102_recommendation.pdf)] (Erişim tarihi: 1.Ekim.2024).
45. Mir H, Haq I, Koul PA. Poor vaccine effectiveness against influenza b-related severe acute respiratory infection in a temperate north indian state (2019–2020): A call for further data for possible vaccines with closer match. *Vaccines*. 2021;9(10):1094. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101094>

46. Rivas MJ, Alegretti M, C oppola L, Ramas V, Chiparelli H, Goñi N. Epidemiology and genetic variability of circulating influenza B viruses in Uruguay, 2012-2019. *Microorganisms*. 2020;8(4):591. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040591>
47. Marchi S, Bruttini M, Milano G, et al. Prevalence of influenza B/Yamagata viruses from season 2012/2013 to 2021/2022 in Italy as an indication of a potential lineage extinction. *Influenza Other Respir Viruses*. 2024;18(9):e13359. <https://doi.org/10.1111/irv.13359>
48. Soydam S, Varan G, Ünal S. İnfluenza/B Yamagata suşu ve influenza aşılıarı. *Flora*. 2024;29(2):165-71. <https://doi.org/10.5578/flora.2024021036>

# Yararlı Bakteriler Fırsatçı Patojenlere Dönüşürse! Probiyotik Alımı Sonrası Gelişen *Alkalihalobacillus clausii* Sepsisi: Türkiye'den İlk Olgu Sunumu<sup>§</sup>

## *If Beneficial Bacteria Become Opportunistic Pathogens! Alkalihalobacillus clausii Sepsis That Develops After Taking Probiotics: First Case Report from Türkiye*

Zeynep Ayaydın<sup>\*@</sup>, Ayşe Batgi Azarkan<sup>\*\*@</sup>, Özge Alkan Bilik<sup>\*\*\*@</sup>, Mehmet Nur Talay<sup>\*\*\*\*@</sup>, Nida Özcan<sup>\*\*\*\*\*@</sup>, Ali Cem Tekin<sup>\*\*@</sup>

\* Artuklu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mardin, Türkiye

\*\* Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır, Türkiye

\*\*\* Selahaddin Eyyubi Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır, Türkiye

\*\*\*\* Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, Diyarbakır, Türkiye

\*\*\*\*\* Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

**Atf/Cite as:** Ayaydın Z, Batgi Azarkan A, Alkan Bilik Ö, Talay MN, Özcan N, Tekin AC. Yararlı bakteriler fırsatçı patojenlere dönüşürse! Probiyotik alımı sonrası gelişen *Alkalihalobacillus clausii* sepsisi: Türkiye'den ilk olgu sunumu. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(1):93-97.

### Öz

#### Alındığı tarih / Received:

12.01.2024 / 12.January.2024

#### Kabul tarihi / Accepted:

27.01.2025 / 27.January.2025

#### Yayın tarihi / Publication date:

24.03.2025 / 24.March.2025

Akut ishal, özellikle çocukluk çağında, potansiyel olarak zararlı sonuçları olan ciddi bir hastalıktır. Probiyotikler genellikle akut ishal tedavisinde kullanılmaktadır. Burada, *Bacillus clausii* (*Alkalihalobacillus clausii*) içeren ticari preparat kullanımı sonrası sepsis gelişen 17 yaşında serebral palsili bir kadın hasta olgusu sunulmuştur. Kan kültürlerinden izole edilen koloniler Vitek-2 otomatik sistemi ile *Bacillus clausii* (*A. clausii*) olarak tanımlanmış ve MALDI TOF-MS ile doğrulanmıştır. Probiyotik preparatından üretilen *A. clausii* suşunun antibiyotik duyarlılık paternine göre hastamızdan izole edilen suşla yüksek ihtimalle aynı suş olduğu kanaatine varılmıştır. Hastaya teikoplanin tedavisi uygulanmıştır. Literatür araştırmamıza göre, bildiği kadarıyla olgumuz Türkiye'de bildirilen ilk *A. clausii* sepsisi olgusudur. Özellikle bağışıklık sistemi çeşitli sebeplerle zayıflamış hastalarda probiyotik preparatlar dikkatli kullanılmalıdır.

#### ORCID Kayıtları

Z. Ayaydın 0000-0002-4701-1212  
A. Batgi Azarkan 0000-0001-6759-2619  
Ö. Alkan Bilik 0000-0002-7376-8032  
M. N. Talay 0000-0002-7361-3823  
N. Özcan 0000-0001-6898-7516  
A. C. Tekin 0000-0003-2456-4903

**Anahtar kelimeler:** Probiyotik, sepsis, *Bacillus clausii*, *Alkalihalobacillus clausii*

#### ABSTRACT

Acute diarrhea is a serious disease with potentially harmful consequences, especially in childhood. Probiotics are generally used in the treatment of acute diarrhea. A case of a 17-year-old female patient with cerebral palsy who developed sepsis after using a commercial preparation containing *Bacillus clausii* (*Alkalihalobacillus clausii*) is presented. Colonies isolated from blood cultures were identified as *Bacillus clausii* (*A. clausii*) by the Vitek-2 automated system and confirmed by MALDI TOF-MS. The antibiotic susceptibility pattern of the *A. clausii* strain produced from the probiotic preparation was determined as most likely the same as the one isolated from the patient. The patient was treated with teicoplanin. To the best of our knowledge after literature review, our case is the first *A. clausii* sepsis case reported in Türkiye. Probiotic preparations should be used with caution, especially in immunocompromised patients.

<sup>§</sup> Bu çalışmanın ilk verileri XL. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (16-20 Kasım 2022, Belek, Antalya) e-poster bildiri olarak sunulmuştur.

✉ zeynepayaydin@gmail.com

**Keywords:** Probiotic, sepsis, *Bacillus clausii*, *Alkalihalobacillus clausii*

## GİRİŞ

İnsan bağırsağını geçici olarak kolonize ederek simbiyotik ilişkiye giren ve temelde insan sağlığına yararlı etkileri bulunan probiyotik mikroorganizmalar, sindirim sistemini düzenlemeye ve bağışıklık sistemini desteklemeye yardımcı olmaktadır<sup>(1)</sup>. Bağırsağın patojen mikroorganizmalarla kolonizasyonunu engelleyen bariyeri güçlendirerek immünolojik savunmayı desteklemektedir<sup>(2)</sup>. Bu bariyerin çeşitli hastalıklar veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonucu bozulmasıyla, patojen mikroorganizmalar konağın bağırsağına yerleşebilmektedir. Çoğunlukla probiyotik olarak kullanılan bakteriler *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus* gibi bakteriler veya *Saccharomyces boulardii* gibi mantarlardır<sup>(3,4)</sup>. Probiyotiklerin faydaları arasında; patojenik bakterilerin bağırsağa kolonizasyonunu önlemeleri, antibakteriyel maddeler (bakteriyosin) salgılayıp patojen bakterilerin çoğalmasını kısıtlayarak antagonize etmeleri ve salgısal IgA antikorlarının üretimini uarmaları yer almaktadır. Bu etkileri sayesinde probiyotiklerin başta antibiyotik kullanımına bağlı gelişen kolit olmak üzere cerrahi hastalar ve immün yetmezliği olan kişilerde oluşan ishalin tedavisinde kullanılabilirdiği görülmüştür<sup>(4)</sup>.

*Bacillus clausii*; toprakta yaşayan, basil şeklinde, Gram-pozitif, hareketli ve endospor oluşturabilen bir bakteridir. Nomenklatürde 2020 yılında *Alkalihalobacillus* cinsine taşınmış ve *Bacillus clausii* ismi sinonim olarak kalmıştır. Çoğunlukla katalaz pozitif olup peritriş kirpiklerle hareketli olabilmektedirler<sup>(5)</sup>. *Alkalihalobacillus* türlerinin probiyotik olarak kullanımları, özellikle oluşturdukları endosporlardan kaynaklanmaktadır<sup>(6)</sup>. Endosporlar sayesinde midenin asidik ortamından geçerek hayatta kalabilen mikroorganizmalardır<sup>(7)</sup>. Yetişkin hastalarda yürütülen ileriye dönük klinik araştırmalar, *Alkalihalobacillus clausii*'nin akut ishalin tedavisinde etkili ve güvenli olduğunu göstermektedir<sup>(8,9)</sup>.

Bu çalışmamızda ishal, ateş ve solunum yetmezliği bulgularıyla hastanemize başvuran, serebral palsili ve ishal sebebiyle uzun süreli probiyotik kullanımı öyküsü olan 17 yaşındaki kadın hastanın kan kültürlerinden

izole edilen *A. clausii* olgusu sunulmuştur. Bilindiği kadarıyla olgumuz, *A. clausii*'ye bağlı sepsis vakaları ile ilgili ülkemizde bildirilen ilk olgu sunumudur.

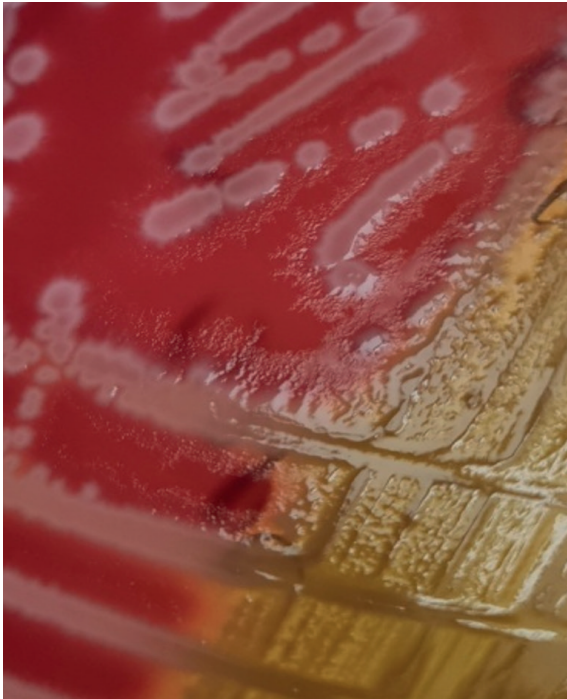
## OLGU

Bu olgu sunumu için hastadan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Olgumuz ishal, kusma, ateş ve solunum sıkıntısı ile önce başka bir sağlık kurumuna başvurmuş, şikâyetleri yaklaşık 10 gün devam etmiş 17 yaşındaki serebral palsili bir hastadır. Hastada karaciğer fonksiyon testleri bozukluğu, C-Reaktif Protein (CRP) yüksekliği, koagülasyon bozukluğu tespit edilmiş, toraks Bilgisayarlı Tomografi (BT) bulgularında Coronavirus Infectious Disease-19 (COVID-19) düşünülmemiş ve pnömoni ile uyumlu olduğu düşünülerek hastanemize sevk edilmiştir. Sevkedilmeden önce hastanın *A. clausii* içeren probiyotik (Enterogermina®: *Bacillus clausii* (*Alkalihalobacillus clausii*)) spor süspansiyonu 2 milyar spor / 5 mL, Sanofi-Aventis, İtalya) kullandığı öğrenilmiştir. Hastamız akut gastroenterit, sepsis ve çoklu organ yetmezliği ön tanısıyla hastanemiz acil servisine getirilmiştir. Hastamızın sağ ve sol kol kan kültürleri alınmıştır. Beyaz kan hücresi (White Blood Cell, WBC)  $8.56 \times 10^3 / \text{mm}^3$  (Mindray BC 6800, Çin), prokalsitonin  $>100 \text{ ng/mL}$ , ferritin  $2000 \mu\text{g/L}$  (Roche 6020, ABD), alanin amino transferaz (ALT)  $433 \text{ U/L}$ , aspartat amino transferaz (AST)  $638 \text{ U/L}$ , laktat  $2.5 \text{ mmol/L}$ , CRP  $32 \text{ mg/L}$  (Abbott Architect C8000, ABD) değerleri bulunmuştur. Vankomisin alerjisi sebebiyle hastaya ampirik olarak teikoplanin ve meropenem başlanmıştır. Laboratuvarımıza gelen sağ ve sol kol kan örnekleri BD Bactec™ FX40 (ABD) otomatize kan kültür cihazına yüklenmiştir. Beşinci saatte pozitif sinyal veren kan kültür şişelerinden %5 koyun kanlı agar (RTA, Türkiye), Eosine Methilen Blue Agar (RTA, Türkiye), Çikolata Agar (RTA, Türkiye) besiyerlerine ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda koyun kanlı agarda beta hemolitik koloniler görülmüştür. Koyun kanlı besiyerinde üreyen kolonilerden yapılan Gram boyamada Gram pozitif, dallanma göstermeyen, katalaz testi pozitif basiller görülmüştür. Tüpte hareket besiyerine yapılan dik batırma ekimi sonucu bakterinin hareketli olduğu tespit edilmiştir. Koloniler Vitek-2 (Biomérieux, Fransa) identifikasyon

antibiyoqram cihazına yüklenmiştir. Her iki kol kan örneklerinde üreyen izolat cihaz tarafından *Bacillus clausii* (*A. clausii*) olarak tanımlanmıştır. Bakteri, matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyonu-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-ToF/MS; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kütle spektrometre yöntemiyle de tür düzeyinde tanımlanmıştır.

*Alkalihalobacillus* kolonilerinden CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) M45 standartlarına göre, *Bacillus* (*Alkalihalobacillus*) türleriyle ilgili belirtilen antibiyotikler ve MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) değerleri dikkate alınarak E-test (bioMérieux, Fransa) stripleri ile duyarlılık testleri yapılmıştır. İzolatımız penisiline dirençli (MİK=32 µg/mL), vankomisin (MİK=0.5 µg/mL) ve teikoplanine (MİK=0.094 µg/mL) duyarlı bulunmuştur. CLSI M45 standart kılavuzunda teikoplaninin MİK değeri ile ilgili yorumlayıcı yönerge bulunmadığından rapor edilememiştir. Aynı zamanda hastanın kullanmış olduğu ticari probiyotik (Enterogermina®: *Bacillus clausii* (*A. clausii*) spor süspansiyonu 2 milyar spor/5 mL, Sanofi-Aventis, İtalya) suşu buyyona alınarak 4-5 saat 37°C'de etüvde bekletildikten sonra, %5 koyun kanlı agara (RTA, Türkiye) ekilmiştir. Üreyen koloniler (Şekil 1) Vitek-2 (bioMérieux, Fransa) identifikasyon



Şekil 1. %5 koyun kanlı agardaki *Bacillus clausii* kolonileri

antibiyoqram cihazında *Bacillus clausii* (*A. clausii*) olarak tanımlanmıştır. E-test (bioMérieux, Fransa) stripleri ile duyarlılık testleri çalışılmıştır. Probiyotik suşumuz da penisiline dirençli, vankomisin ve teikoplanine duyarlı bulunmuştur. Hastadan elde ettiğimiz izolatımız ile probiyotikten elde edilen suşun antibiyotik duyarlılık paternine bakılarak yüksek ihtimalle fenotipik olarak aynı suş olduğu kanaatine varılmıştır. Klinisyen ile iletişime geçilip vankomisin ve teikoplanin duyarlılığı bildirilmiştir. Hastanın vankomisin alerjisi sebebiyle teikoplanin ve meropenem tedavisine başlanmış ve tedaviye iyi yanıt alınmıştır. Pediatri yoğun bakımda 21 gün yatırılan hasta, bu süre sonunda iyileşmiş ve taburcu edilmiştir.

## TARTIŞMA

Probiyotiklerin çocuk ve erişkin hastalarda akut ishalin tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ticari ürünlerde bulunan başlıca mikroorganizmalar, laktik asidi fermente eden bakteriler (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*) ve *Bifidobacterium* türleridir<sup>(2)</sup>. *Bacillus* (*Alkalihalobacillus*) sporları içeren ticari ürünler de probiyotik olarak kullanılmaktadır.

*Bacillus anthracis* dışındaki *Bacillus* (*Alkalihalobacillus*) türleri ile oluşan fırsatçı enfeksiyonlar 19. yüzyılın sonlarından beri bildirilmektedir. İzole edilen *Bacillus* (*Alkalihalobacillus*) suşlarını klinik bulgularına göre değerlendirmek ve bunları sadece kontaminant olarak kabul edip ihmal etmekten kaçınmak gerekir<sup>(5)</sup>.

2018 yılındaki bir çalışmada akut pediyatrik diyarede probiyotik olarak kullanılan *B. clausii* (*A. clausii*)'nin dışkılama sayısı ve hastanede kalış süresini kısaltarak iyi bir tedavi seçeneği olabileceği bildirilmiştir<sup>(10)</sup>. Ancak bu mikroorganizmalar fırsatçı patojen olabilmektedirler. Nitekim başka bir araştırmada, sağlıklı gönüllülere *A. clausii* içeren tek doz oral probiyotik uygulamasından sonra, bu bakterilerin gastrointestinal sistemde 12 güne kadar canlı kalabildiği gösterilmiştir<sup>(11)</sup>. Bu sebeple bağışık zayıflığı olan çocuk veya erişkin hastalarda *Alkalihalobacillus* suşlarının bakteriyel translokasyon sonucunda enfeksiyon oluşturabilme potansiyellerinin olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Literatürde fırsatçı patojen olabilen *B. subtilis* veya *A. clausii* içeren probiyotik kullanımıyla gelişen sepsis vakaları göze çarpmaktadır. Bu vakaların genellikle çeşitli predispozan faktörler sebebiyle bağışıklığı zayıflamış hastalar oldukları dikkat çekmektedir.

1998 yılında bildirilen bir raporda kronik lenfositik lösemili 73 yaşındaki erkek hastada, ishal sebebiyle bir ay süreyle *B. subtilis* içeren probiyotik kullanımıyla gelişen septisemi olgusu sunulmuştur<sup>(12)</sup>. Olguda hematolojik malignite, yaş faktörü dikkat çekmektedir.

2019 yılında sunulan bir raporda konjenital kalp hastalığı, ateş, alt solunum yolu enfeksiyonu olan beş aylık erkek bebeğe ishal sebebiyle *A. clausii* içeren probiyotik başlanmasıyla gelişen septisemi olgusu bildirilmiştir<sup>(13)</sup>. Bebeğe ventriküler septal defekt, pulmoner darlık tespit edilmiştir. Bebeğe probiyotik verildikten üç hafta sonra kötüleşmiş ve kan kültürlerinde *A. clausii* üremiştir. Hasta vankomisinle 21 gün tedavi edilmiş ve iyileşme sağlanmıştır. Olgumuzda da serebral palsy varlığı dikkat çekicidir ve benzer şekilde vankomisin ile tedavi edilmiştir.

2020 yılında, tip-2 diabeti olan yetişkin erkek hastada *A. clausii* içeren probiyotik kullanımıyla gelişen başka bir sepsis olgusu bildirilmiştir<sup>(14)</sup>. Geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavi sonucu oluşan ishal sebebiyle *A. clausii* içeren probiyotik başlanmıştır. 10 gün sonra hasta kötüleşmiş ve kan kültürlerinde *A. clausii* üremiştir. Hasta 21 gün teikoplanin ile tedavi edilerek taburcu edilmiştir. Literatürdeki diğer raporlarda glikopeptid grubu antibiyotik olan vankomisin kullanılırken<sup>(12,13)</sup> bu çalışma ve bizim olgumuzda başka bir glikopeptid olan teikoplanin kullanılmıştır. Bu sebeple teikoplaninin *A. clausii*'ye bağlı sepsis tedavisinde iyi bir alternatif olabileceği varsayılabilir. Ancak bununla ilgili daha fazla araştırma yapılmalıdır.

Son yıllarda yapılmış olan bir derleme çalışmasında, probiyotiklerin sepsise yol açması ile ilgili 1995'ten 2021'e kadar toplam 49 vaka raporu belirlenmiş, bunların %4'ünün *A. clausii* kaynaklı olduğu bildirilmiştir<sup>(15)</sup>. 2021 yılına ait bir çalışmada aktif peptik ülseri ve akut ishali olan bir hastada probiyotik

kullanımı sonucu gelişen *A. clausii* bakteriyemisi<sup>(16)</sup>, 2022 yılındaki bir çalışmada *A. clausii* sporlarını içeren oral süspansiyon alan diyabetik yetişkin bir kadında cerrahi bir müdahale sonrasında meydana gelen bir sepsis olgusu<sup>(17)</sup> ve 2023 yılındaki bir çalışmada da, dört aylık bir bebekte akut ishal sebebiyle *A. clausii* içeren probiyotik kullanımından sonra gelişen sepsis vakası bildirilmiştir<sup>(18)</sup>.

Probiyotik olarak kullanılan *A. clausii* suşları bakteriyel translokasyon sonucunda enfeksiyon oluşturabilme potansiyeli kazanabilirler. Ayrıca bu bakterilerin birden fazla antibiyotiğe karşı direnç genleri taşıyabileceği de bilinmelidir<sup>(19)</sup>. Bu durum tedavide zorluğa sebep olabilir. Bu nedenle üretilen suşların antibiyotik duyarlılıkları mutlaka test edilmelidir.

Sonuç olarak olgumuz, bağışıklığı zayıflamış hastaların akut ishal sebebiyle canlı mikroorganizma içeren farmasötik ürünlerle tedavi edilirken maruz kalabileceği yüksek riski göstermektedir. Probiyotikler bağışıklığı zayıf, yaşlı, çocuk hastalar veya kronik hastalıkları olan vakalarda dikkatli kullanılmalıdır. Bu tür hastalara uzun süre ve yüksek sayıda canlı mikroorganizma verilmemesi gerekliliği akılda tutulmalıdır. Ek olarak, mikrobiyoloji laboratuvarlarında tek kan kültüründen izole edilen *Alkalihalobacillus* türleri genellikle kontaminant olarak değerlendirilebilmektedir. Bu yüzden *Alkalihalobacillus*'ları kontaminant olarak raporlamadan önce, septisemik hastalarda birden fazla kan kültürünün incelenmesi ve aynı suşun birden fazla kültürde üretilmesinin kontaminasyonu değil enfeksiyonu gösterebileceğini vurgulamak isteriz.

**Etik Kurul Onayı:** Bu olgu sunumu için hastadan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

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

**Finansman:** Yoktur/bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** For this case report, an informed consent form was obtained from the patient.

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

**Funding:** None/not declared.

## KAYNAKLAR

1. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis*. 2008;46(Suppl 2):S58-61. <https://doi.org/10.1086/523341>
2. Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Beslenme ve Enfeksiyon. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti; 2008;98-105.
3. Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol*. 2017;8:1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
4. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol*. 2009;27(3):202-9. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.53201>
5. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Bacillus* ve Diğer Endospor Yapan Bakteriler. Çeviri Editörü: Başustaoglu A. *Klinik Mikrobiyoloji Manual of Clinical Microbiology* 9. Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic Ltd Şti; 2009;455-73.
6. Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7(6):579-86. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
7. Duc le H, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(4):2161-71. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004>
8. Nista EC, Candelli M, Cremonini F, et al. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: Randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20(10):1181-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02274.x>
9. Sudha MR, Bhonagiri S, Kumar MA. Efficacy of *Bacillus clausii* strain UBBC-07 in the treatment of patients suffering from acute diarrhoea. *Benef Microbes*. 2013;4(2):211-6. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0034>
10. Ianiro G, Rizzatti G, Plomer M, et al. *Bacillus clausii* for the treatment of acute diarrhea in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*. 2018;10(8):1074. <https://doi.org/10.3390/nu10081074>
11. Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Lupetti A, Senesi S. Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation. *J Appl Microbiol*. 2015;119(2):552-9. <https://doi.org/10.1111/jam.12848>
12. Oggioni MR, Pozzi G, Valensin PE, Galieni P, Bigazzi C. Recurrent septicemia in an immunocompromized patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(1):325-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.325-326.1998>
13. Joshi S, Udani S, Sen S, Kirolikar S, Shetty A. *Bacillus clausii* septicemia in a pediatric patient after treatment with probiotics. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(9):228-30. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002350>
14. Princess I, Natarajan T, Ghosh S. When good bacteria behave badly: a case report of *Bacillus clausii* sepsis in an immunocompetent adult. *Access Microbiol*. 2020;3:2(4):acmi000097. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000097>
15. D'Agostin M, Squillaci D, Lazzarini M, Barbi E, Wijers L, Da Lozzo P. Invasive infections associated with the use of probiotics in children: A systematic review. *Children (Basel)*. 2021;8(10):924. <https://doi.org/10.3390/children8100924>
16. García PJ, Alzate AJ, Hoyos AJ, Cristancho E. Bacteremia after *Bacillus clausii* administration for the treatment of acute diarrhea: A case report. *Biomédica*. 2021;41(Suppl 2):13-20. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5662>
17. Miotti MA, Conti E, Fornaro G, et al. A case of possible *Bacillus clausii* sepsis. *J Bacteriol Infect Dis*. 2022;6(3):111. <https://doi.org/10.35841/aabid-6.3.111>
18. Muñoz M, Castaño GE, Esquivel SR, Alvarado M. Septicemia due to *Bacillus clausii* after the use of probiotics. A complication to keep in mind. *Andes Pediatr*. 2023;94(3):379-85. <https://doi.org/10.32641/andespediatr.v94i3.4417>
19. Abbrescia A, Palese LL, Papa S, Gaballo A, Alifano P, Sardanelli AM. Antibiotic sensitivity of *Bacillus clausii* strains in commercial preparation. *Curr Med Chem*. 2014;1(2):102-10. <https://doi.org/10.2174/2212707002666150128195631>



# YAZARLARA BİLGİ

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

## Başvuru

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

## Prof. Dr. Çağrı Ergin

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Kınıklı Kampüsü / Denizli

Tel: 0258 296 2491

E-posta: [tmcdditor@gmail.com](mailto:tmcdditor@gmail.com)

## Metin Çeşitleri

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

## Metin yazımı esnasında uyulacak kurallar

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

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

## Örnekler

### A. Makaleler

- Kaynak yazımlarında italik, boşluk, noktalama işaretleri kullanımına kesinlikle dikkat ediniz.
- **Standart Dergi Makalesi:** Courvalin P, Davies J. Mechanisms of resistance to aminoglycosides. Am J Med. 1977;62(6):868-72. <https://doi.org/.....>
  - **Dergi Ekinde (Supplement) yer alan makale:** Snyderman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial Candida infections. Chest. 2003;123(Suppl 5):S500-3. <https://doi.org/.....>
  - **Elektronik dergi makalesi:** Lam PV, Tadros M, Fong IW. Mandibular osteomyelitis due to Raoultella species. JMM Case Rep. 2018;5. İnternet adresi: <http://.....> Erişim tarihi: .././20.. <https://doi.org/.....>

### B. Kitaplar

- **Kitap:** Appanna VD. Human Microbes - The Power Within Health, Healing and Beyond. Singapur: Springer Singapur; 2018.

- **e-Kitap:** Appanna VD. Human Microbes - The Power Within Health, Healing and Beyond. Singapur: Springer Singapur; 2018. İnternet adresi: <http://.....> Erişim tarihi: .././20..
- **Kitap bölümü:** Piret J. Antiviral drug resistance in herpesviruses. In: Berghuis A, Matlashewski G, Sheppard D, Wainberg MA (Eds.) Handbook of antimicrobial resistance. New York: Springer-Verlag, 2017:87-122. (Türkçe kitaplar için; cümle sonuna kitabında ifadesini ekleyiniz.)
- **Kurumsal yayın:** CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3. 3rd ed. CLSI, Wayne: ABD; 2008.
- **Sürelî resmi yayın:** TC Sağlık Bakanlığı. Bulaşıcı hastalıklar sürveyans ve kontrol esasları yönetmeliği. Resmi Gazete. 30.05.2007(26537).
- **Sürelî resmi yayın (internet):** TC Sağlık Bakanlığı. Bulaşıcı hastalıklar sürveyans ve kontrol esasları yönetmeliği. Resmi Gazete. 2007(26537). İnternet adresi: <http://.....> Erişim tarihi: .././20..
- **Kongre Bildiri Özeti:** Başustaoğlu AC, Süzük S, Mumcuoğlu İ, ve ark. Kan kültürü uygulamalarının değerlendirilmesi: EpiCenter verilerinin kullanımı. XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya; 2016:TPS-85.
- **Tez:** Öktem İMA. Endoservikal sürüntü örneklerinde Chlamydia trachomatis hücre kültürü sonuçlarının direk floresan antikor (DFA) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile karşılaştırılması [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 1998.

### C. Sanal Ortam

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

### Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

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

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

# ETİK POLİTİKALAR

## Yayın Etiği

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

## Yazarların Etik Sorumlulukları

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

- Makalenin bilimsel ve etik kurallara uygunluğu yazarların sorumluluğundadır. Yazarın çalışmayla ilişkili verilerin doğruluğundan emin olması, araştırmasına ilişkin kayıtlarını düzenli tutması ve olası bir istek üzerine bu verilere erişim sağlayabilmesi gerekir.
- Yazarların gönderdikleri çalışmaların özgün olması beklenmektedir. Başka çalışmalardan yararlanmaları durumunda eksiksiz ve doğru bir biçimde atıfta bulunmaları ve/veya alıntı yapmaları gerekmektedir.
- Yazarlar gönderdiği makalenin başka bir yerde yayınlanmadığından veya kabul edilmediğinden emin olmalıdır.
- Yazar listesinde yer alan kişilerin tümü, çalışmanın yürütülmesi ve yayımlanması sürecinde yazarlık katkısı sunmuş olması gerekmektedir. Yazarlık ölçütlerini tam karşılamayan ve çalışmaya katkı sağlayanlar varsa teşekkür bölümünde belirtilmelidir.
- Çok yazarlı makalelerde yazarların araştırmaya katkıları (fikir oluşturma, çalışmanın tasarımı, uygulama, istatistik, yazımı gibi) telif hakkı devir formunda belirtilerek, editör kuruluna iletilmelidir.
- Yazarların isim sıralaması ortak verilen bir kararla belirlenmelidir. Tüm yazarlar yazar sıralamasını Telif Hakkı Devir Formu'nda imzalı olarak belirtmek zorundadır. Dergiye makale gönderildikten sonra yazarlardan hiçbirinin ismi, tüm yazarların yazılı izni olmadığı sürece yazar listesinden silinemez veya yeni bir isim yazar olarak eklenemez. Ayrıca telif hakkı devir formunda belirtilen yazar sırası değiştirilemez.
- Makalenin gönderim aşamasında, Telif Hakkı Devir Formu'nun imzalı ve taranmış hali dergi yönetim sistemine (<http://www.journalagent.com/tmcd/>) yüklenmesi gerekmektedir.
- 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 yürütme gibi rol ve yükümlülükleri yerine getirmek zorundadırlar.
- Editörler, makalelerin içerik ve yayın sürecindeki kalitesinden sorumlu olup hatalı durumlarda gerekli düzeltmelerin yapılmasını sağlar.
- Editörler, hakemlerin, çalışmalarını tarafsız ve bağımsız olarak değerlendirmelerini sağlama, yeni hakem belirlerken niteliklerini dikkate alma, derginin yayın politikaları ve gelişimine ilişkin sürekli etkileşim içerisinde olma, gerektiğinde bilgi ve eğitim toplantıları yapma gibi yükümlülükleri yerine getirmelidir.
- Editörler, yazarların etnik kökeni, cinsiyeti, uyruğu, dini ve siyasi özelliklerinden bağımsız olarak, dengeli, yansız ve adil şekilde makaleleri değerlendirmekle yükümlüdür.
- Editörler, sisteme yüklenen makalelere ilişkin tüm bilgileri, makale yayınlanana kadar gizli tutmak zorundadır. Ayrıca, yazarlara açıklayıcı ve bilgilendirici şekilde geri bildirim vermelidir.
- Editörler, etik ihlale ilişkin bir şikayet olması durumunda, COPE'un iş akışlarını dikkate alır.
- Editörler, hakem atama konusunda tam yetkili olup yazarlar, editörler ve hakemler arasında çıkar çatışmasını korur.
- Editörler, hakem havuzunun genişletilmesi, makalenin konu alanına uygun hakemi atamaya özen gösterilmesi, kör hakemlik sürecinde hakem bilgilerinin gizliliğini sağlama, değerlendirme sürecinin tarafsız, bilimsel ve nesnel bir şekilde yapılabilmesi için gerekli bilgi ve

desteği sağlama, hakem performansını artırmaya yönelik uygulamalar ve politikaların belirlenmesi gibi çalışmalarını yerine getirmelidir.

- Editörler, değerlendirilen çalışmalarda yer alan deneklere veya görsellere ilişkin kişisel verilerin korunmasını sağlamakla yükümlüdür. Çalışmada kullanılan deneklerin/ katılımcıların, açık onayının alındığına 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 tamamlanması 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 "Çift Kör Hakemlik" yöntemiyle değerlendirilmektedir. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi için değerlendirme yapan hakemlerin aşağıdaki etik ilkeler uyması beklenmektedir.

- Hakemler, makaleleri değerlendirirken, yazarların etnik kökeni, cinsiyeti, uyruğu, dini ve siyasi özelliklerinden bağımsız şekilde, zamanında inceleyerek, tarafsız bir değerlendirme yapmalıdır.
- Hakemler, makale ile ilgili çalışmalarını 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 paylaşmamları gerekir.
- Gizlilik ilkesi gereği hakemler, değerlendirme süreci tamamlandıktan sonra makalelerin kopyalarını yok etmelidir.
- Hakemler, potansiyel çıkar çatışmalarının (mali, kurumsal, işbirlikçi ya da yazar/yazarlar arasındaki diğer ilişkiler) farkında olmalı ve gerekirse bu konuda editörleri uyarmalıdır.

#### **Yayıncının Etik Sorumlulukları**

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

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

# HAKEMLERE BİLGİ

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

## Hakem daveti

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

## Makalelerin genel değerlendirilmesi;

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

## Derlemelerin değerlendirilmesi

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

## Olgu sunumu değerlendirilmesi

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

## Çevresel araştırmalar

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

## Hakem raporu

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

