Cilt / *Volume* 46
Sayı / *Number* 2
Haziran / *June* 2016

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✔ Antisens Oligonükleotitler ve Antibakteriyel Kullanımları
- ✔ Human Papillomavirusun L1 Gen Bölgesinin Klonlanması ve Açıklatılması
- ✔ Yoğun İnce Benekli (DFS) Paterninde Antinükleer Antikor Varlığı Tespit Edilen Hastaların ICD Kodlarının Retrospektif Olarak Araştırılması
- ✔ *Candida albicans*'ın Salgısal Asit Proteinaz Etkinliğinin Araştırılmasında İn Vivo Model Olarak *Galleria mellonella* Larvanın Kullanılması

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 46

Sayı / *Number* 2

Haziran / *June* 2016

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 46 Sayı / *Number* 2 Haziran / *June* 2016

Editör / *Editor in Chief*

Çağrı Ergin
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

Editör Yardımcıları / *Associate Editors*

Sebahat Aksaray
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul

Nilay Çöplü
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

Ayşe Esra Karakoç
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

Burçin Şener
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Danışmanlar Kurulu / *Advisory Board*

Nurten Altanlar (Ankara Üniversitesi)
İmre Altuğlu (Ege Üniversitesi)
Pınar Çıralıgil (Çukurova Üniversitesi)
Melek Demir (Pamukkale Üniversitesi)
Mine Doluca Dereli (Dokuz Eylül Üniversitesi)
Koray Ergünay (Hacettepe Üniversitesi)
Meral Gültekin (Akdeniz Üniversitesi)
Macit İlkit (Çukurova Üniversitesi)
Ayşe Kalkancı (Gazi Üniversitesi)
İlknur Kaleli (Pamukkale Üniversitesi)
Aynur Gül Karahan (Süleyman Demirel Üniversitesi)
Mihriban Korukluoğlu (Uludağ Üniversitesi)
Ayhan Kubar (Gülhane Askeri Tıp Akademisi)
Dilek Yeşim Metin (Ege Üniversitesi)
Feza Otağ (Mersin Üniversitesi)
Ayşegül Taylan Özkan (Hitit Üniversitesi)
Süleyha Hilmioğlu Polat (Ege Üniversitesi)
Murat Telli (Adnan Menderes Üniversitesi)
Hakan Uslu (Atatürk Üniversitesi)
Nagihan Yalçın (Pamukkale Üniversitesi)
Fügen Yarkın (Çukurova Üniversitesi)

Yayımlanan sayıya ait değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

"Türkiye Atıf Dizini" tarafından indekslenmektedir.

Sahibi / *Owner*

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

Prof. Dr. Zeynep Çiğdem Kayacan

Yazışma Adresi / *Correspondence Adres*

Prof. Dr. Çağrı Ergin
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası
Kınıklı / Denizli
Tel: 0258 296 24 91
e-posta: tmcdeditor@gmail.com
www.tmc-online.org

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

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Her Hakkı Mahfuzdur.
Turkish Society of Microbiology, All Rights Reserved

Copyright © 1993 **Yayın Türü:** Yerel Süreli

Basım Yeri / *Printed by*

Logos Yayıncılık Tic. A.Ş.
Yıldız Posta Cad. Sinan Ap. No. 36 K.12 D.66-67
34349 Gayrettepe-İstanbul
Tel: 0212 288 50 22 - 288 05 41 **Faks:** 0212 211 61 85
e-posta: logos@logos.com.tr www.logos.com.tr

Bu dergi **Acid Free (Alkali)** kağıda basılmaktadır. / *This journal is printed on* ***Acid-Free paper***

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 46 Sayı / *Number* 2 Haziran / *June* 2016

İÇİNDEKİLER / *CONTENTS*

DERLEME / *REVIEW*

- **Antisens Oligonükleotitler ve Antibakteriyel Kullanımları**

  Antisense Oligonucleotids and Antibacterial Use

  Yamaç TEKİNTAŞ, Devrim DEMİR DORA, Mine HOŞGÖR LİMONCU **51-57**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / *CLINICAL INVESTIGATIONS*

- **Human Papillomavirusun L1 Gen Bölgesinin Klonlanması ve Açıklatılması**

  Cloning and Expression of L1 Gene Region of Human Papillomavirus

  Yasemin BULUT, Zülal AŞÇI TORAMAN, Adnan SEYREK **58-62**

- **Son Üç Yılda Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları**

  Distribution and Antifungal Susceptibilites of Candida Species Isolated from Blood Cultures at Kahramanmaraş Necip Fazıl City Hospital in the Last Three Years

  Esra ÖZKAYA, Ahmet ÇALIŞKAN, Özlem KİRİŞÇİ, Seray TÜMER **63-68**

- ***Candida albicans*'ın Salgısal Asit Proteinaz Etkinliğinin Araştırılmasında İn Vivo Model Olarak *Galleria mellonella* Larvanın Kullanılması**

  Using Galleria mellonella Larvae as the in Vivo Model in Investigating the Secretory Acid Proteinase Activity of Candida albicans

  Ali ALVANDIAN, Mohammed Hasan JAWADİ, Zeynep Nur ALTINTAŞ, Naci YILDIZ, Meral KARAMAN **69-75**

- **Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarında 2011-2015 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı**
  Frequency of Intestinal Parasites Detected in the Laboratory of Medical Parasitology in Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital between 2011 and 2015
  Serkan BAŞTEMİR, Koray ÖNCEL, Kor YERELİ, Ali Ahmet KİLİMCOĞLU, Cüneyt BALCIOĞLU, Nogay GİRGİNKARDEŞLER **76-81**

- **Yoğun İnce Benekli (DFS) Paterninde Antinükleer Antikor Varlığı Tespit Edilen Hastaların ICD Kodlarının Retrospektif Olarak Araştırılması**
  Retrospective Investigation of ICD Codes of Patients with Dense-Fine Speckled (DFS) Pattern Antinuclear Antibodies
  Erhan KONGUR, Neşe KAKLIKAYA, Gülçin BAYRAMOĞLU, Esra ÖZKAYA, Şükran ÖNDER, Rukiye AKYOL, Bünyamin KASAP **82-87**

- **Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında CTX-M Enzimlerinin Belirlenmesi**
  Detection of CTX-M Enzymes in ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamases) Producing Escherichia coli and Klebsiella spp Isolates
  Esra DENİZ ÖGEDEY, Füsun CÖMERT, Füruzan KÖKTÜRK, Canan KÜLAH, Elif AKTAŞ **88-96**

YAZARLARA BİLGİ ..... **V-VI**

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(2):51-57, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.051

Derleme

Antisens Oligonükleotitler ve Antibakteriyel Kullanımları

Yamaç TEKİNTAŞ*, Devrim DEMİR-DORA, Mine HOŞGÖR-LİMONCU***
**Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*
***Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı*

ÖZET

Antisens tedavi stratejisi, çeşitli genlerin protein oluşturmadan susturulması amacıyla oligodeoksiribonükleotidlerin kullanılmasıdır. Antisens mekanizma, hedef mRNA'ya oligonükleotid dizisinin Watsons-Crick baz eşleşme yoluyla bağlanması sonucu gerçekleşmektedir. Bağlanmadan sonra iki temel yolak, ilgili genin protein oluşumunu engeller. Bunlardan ilki, oligonükleotidin bağlandığı bölgede RNaz H aracılı degredasyon oluşturmasıdır. RNaz enzimi ile parçalanan gen dizisinden translasyon olası olmadığı için protein oluşumu engellenir. İkincisi ise oligonükleotidin bağlanarak ilgili gen bölgesini kapatmasıyla oluşur. Böylece ribozomun gen dizisini okuması sterik olarak engellenir, posttranskripsiyonel işlemler inhibe edilir ve gen, ürün oluşturamaz.

Bu moleküllerin nükleazlardan korunmaları için çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Bu modifikasyonlara göre antisens oligonükleoititler (ASO) kuşaklara ayrılabilirler. Modifikasyonlar ile nükleazlardan korunmalarına rağmen, hücre içlerine girişleri sınırlıdır. Bu kısıtlılığı giderebilmek amacıyla konjuge peptidler ve lipid bazlı taşıyıcı sistemler gibi çeşitli yöntemler kullanılması gerekmektedir.

Bakteri için esansiyel olan genlerin inhibisyonuyla ASO dizileri antibakteriyel olarak kullanılabilir. Ayrıca direnç genlerini hedef alan diziler sayesinde bakteriler duyarlı hale getirilebilirler. Antibiyotik direnç mekanizmalarından etkilenmeyen antisens tedavi stratejisinin pek çok bilim insanının ilgisini çekmektedir. Bu moleküllerin genel özellikleri, çalışma prensipleri ve bakteri eradikasyonu amacıyla kullanımını içeren çalışmalar bu derlemede özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Antisens oligonükleotidler, gen susturumu, antisens antibakteriyaller*

SUMMARY

Antisense Oligonucleotids and Antibacterial Use

The antisense treatment strategy is to use oligodeoxyribonucleotides for the purpose of silencing various genes before they start producing proteins. The antisense mechanism is established by binding oligonucleotide strands to the target mRNA by way of Watsons-Crick base pairing. After binding, two basic pathways prevent the relevant gene from producing protein. The first of these is the formation of RNase H-mediated degradation by the oligonucleotide at the site of binding. Production of protein is hindered because translation becomes impossible from the gene strand that was broken down by the RNase enzyme. The second occurs when the oligonucleotide binds and closes the relevant gene site. In this way, ribosome is sterically hindered from reading the gene strand, posttranscriptional procedures are hindered and the gene cannot make production.

Various chemical modifications of these molecules to protect them from nucleases was performed. According to these modifications antisense oligonucletoides (ASO) can be divided into generations. Despite the protection from nucleases with modifications they have limited access to the cell interior. In order to eliminate this restriction it is necessary to use various methods such as peptide conjugates, lipid based carrier systems.

ASO sequences can be used as antibacterials by inhibition of essential genes for bacteria. Besides bacteria can be made susceptible by oligonucleotides targeting the resistance genes. The antisense treatment strategy which is not affected by antibiotic resistance mechanisms, attracts the attention of many scientist. General properties of these molecules, mode of action and studies involving the use of these molecules in bacterial eradication are summarized in this review.

Keywords: *Antisense oligonucleotides, gene silencing, antisense antibacterials*

GİRİŞ

Antibiyotikler ilk keşfedildiği tarihten günümüze kadar geçen süreçte pek çok insanın yaşamını kurtarmıştır. Ancak bilinen bir gerçek olarak bakteriler bu moleküllere direnç kazanmaktadır. Bu durum halk sağlığı açısından büyük sorunlar oluşturmakta, bu süreçteki en büyük korku ise

Alındığı tarih: 07.06.2016
Kabul tarihi: 20.07.2016
Yazışma adresi: Yamaç Tekintaş, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir
e-posta: yamactekintas@yahoo.com

tüm moleküllere dirençli, tedavi edilemeyen bakterilerin yaratacağı enfeksiyonlardır. Bu durumun, antibiyotikler öncesi devirlere geri dönülmesine neden olabileceği düşünülmektedir[1]. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç, ilaç endüstrisindeki yeni sınıf moleküllerin üretim hızının düşüklüğüyle beraber değerlendirildiğinde, antibiyotikler dışında tedavi yöntemlerinin ve potansiyallerinin değerlendirilmesi gerektiğini açıkça ortaya koymaktadır[2]. Dolayısıyla antibiyotikten farklı yolaklar üzerine etki gösteren, direnç mekanizmalarından etkilenmeyen farklı yaklaşımlar bu çerçevede incelenmektedir. Bakteriyel genlerin susturulması bu anlamda öne çıkan seçeneklerden biridir. Santral dogma kavramı 1958 yılında Francis Crick tarafından ortaya atılıp, bilim dünyası tarafından kabul görmüştür. Genotipik özellikten fenotipik özelliğe kadar geçen süreci açıklayan bu kavram sayesinde DNA'dan RNA'ya ve son ürün olan proteine giden mekanizmaların bütününün keşfedilmesi genlere ait baz dizilimini, fonksiyonlarını açıklanabilir hale getirmiştir[3]. Bu süreçte elde edilen veriler gen inhibisyonun temel prensiplerinin oluşturulmasına da yardımcı olmuştur.

Antisens mekanizma ve Antisens oligonükleotid çeşitleri

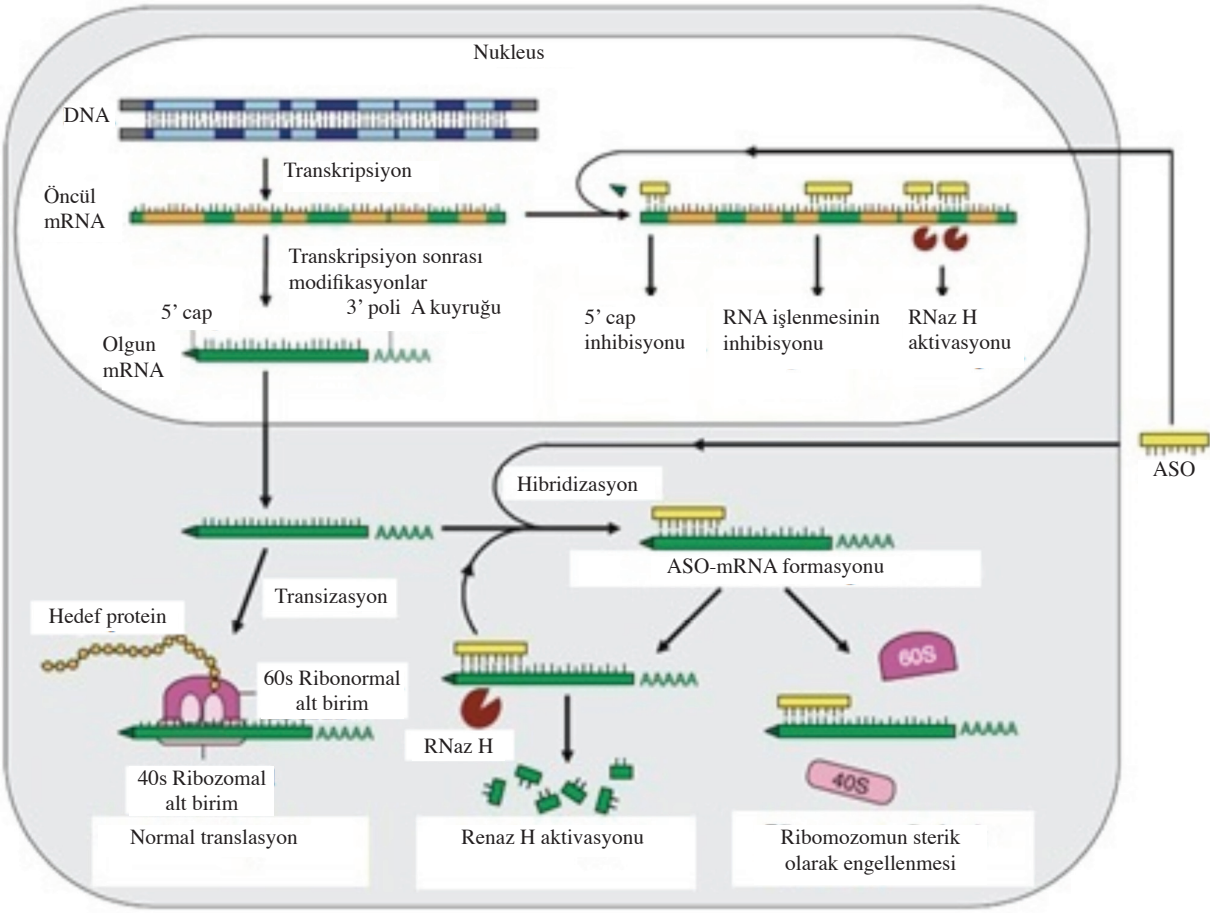
Hastalıkların çoğu zaman proteinlerin eksik veya fazla üretilmesiyle ortaya çıktığı bilinen bir gerçektir. Aynı zamanda enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmalar da yine çeşitli proteinler aracılığı ile enfeksiyon hastalığına yol açmaktadır. Dolayısıyla santral dogma ile açıklanan basamakların bloke edilmesi hastalığa neden olan proteinin oluşmasının inhibisyonuna neden olacağından, hastalıklara veya hastalık etkenlerine ait mekanizmaların bozulması beklenmektedir[4]. 1978 yılında Stephenson ve Zamecnik[5] tarafından "Rous Sarcoma Virus" (RSV) ile yapılan çalışmalar bu anlamdaki ilk örneklerdendir. RSV integrasyon genine oligonükleotidler bağlamak suretiyle oluşturulan çalışmada, viral integrasyonun engellenebildiği tespit edilmiştir. Bu ve bunun gibi yaklaşımlar ve çalışmalar aracılığıyla ortaya çıkmış olan antisens (gen susturumu, "knock down") tedavi yaklaşımı genetik şifre akışının protein oluşmadan engellenmesidir. Bu amaçla ilgili gene ait mRNA dizisine Watsons-Crick baz eşleşmesi sistemiyle belirli uzunlukta oligoükleotitler bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın gerçekleşmesi protein oluşumunu çeşitli mekanizmalar aracılığıyla inhibe etmektedir. Bunlar Şekil 1'de[4] görüldüğü üzere oligonükleotidin bağlanmasıyla;

- Ribozomun mRNA'dan okuma yapmasının sterik olarak engellenmesi,
- Antisens oligonükleotid (ASO) mRNA çift iplikli melez yapısının RNaz H enzimi aracılığıyla degredasyona uğraması,
- Dizilimdeki intron ve ekzonların işlenme mekanizmasının ("splicing") engellenmesi,
- Ribozomun okuma yapması için diziyi tanıyacağı bölge olan 5' cap oluşumunun engellenmesi şeklinde açıklanabilir[4,6].

Antisens tedavinin avantajları:

- Uygun oligonükleotidlerin sentezlenmesi kısa sürer, ilgili gene ait DNA diziliminin veya mRNA diziliminin bilinmesi yeterlidir.
- Moleküllerin hedefi tek boyutludur. Proteinle etkileşimlerde proteinin üç boyutlu yapısının da incelenmesi gerekir.
- Oligonükleotid bağlanması için hidrojen bağları yeterlidir, proteinlerde etkileşim için farklı bağ kuvvetlerine de ihtiyaç duyulur.
- Uygun şekilde hazırlanan ASO'lar istenilen dokuya veya etkene hedeflenebilir[7].

Modifiye edilmemiş DNA veya RNA molekülleri nükleaz ataklarına açıktır. Aynı zamanda zayıf farmakokinetik özellikleri nedeniyle bu şekilde kullanımları kısıtlı olduğu için bu dezavantajları gidermek amacıyla çeşitli modifikas-

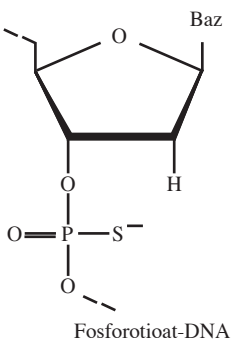


Şekil 1. Antisens oligonükleotidlerin etki mekanizmaları[4].

yonlar yapılması gerekmiştir. Bu değişikliklerde ana hedef bölgeler fosfodiester bağı ve şeker halkasıdır. Yapılan modifikasyonlar sonucu oluşan antisens oligonükleotidler 1., 2., ve 3. kuşak ASO olarak sınıflandırılmıştır[8,9].

1. Kuşak ASO

Bu grup moleküller fosforotioat (phosphorotihoate-PS) modifiye moleküller olarak da tanımlanmaktadırlar (Şekil 2). Fosfodiester bağında oksijen atomu sülfür atomu ile değiştirilerek elde edilmişlerdir[10]. Yapılan bu modifikasyon ile nükleazlara direnç özelliği kazandırılarak molekül daha etkin hâle getirilmiştir. Bu grup oligonükleotidler RNaz H enzimini aktive ederek bağlandığı dizide katlanmalara ve degredasyona yol açarlar. Bununla birlikte, modifi-



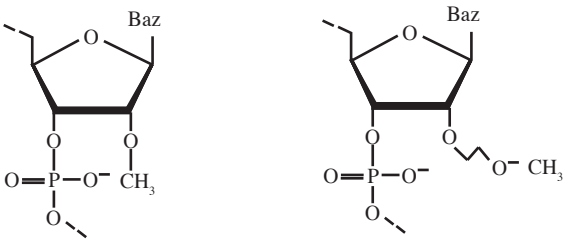
Şekil 2. "1. kuşak ASO" örneği olarak fosforotioat-DNA.

kasyon ASO-mRNA heterodupleksi, nükleotid başına 0.5°C erime derecesi değişikliğine neden olmaktadır. Bu ısı değişikliği moleküllerin afinitelerinde azalmaya neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu gruba ait moleküllerde spesifik olmayan bağlanmalara rastlansa da en sık olarak kullanılmış olan ASO türevi bu gruptur[11,12].

Yirmi bir bazlık nükleotid dizisi içeren "fomivirsen" piyasa adıyla ruhsatlandırılmış ve klinik kullanıma girmiş bir moleküldür[4].

2. Kuşak ASO

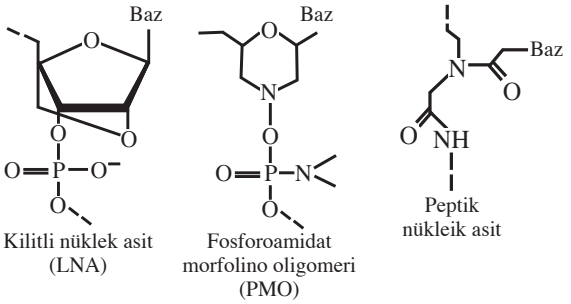
Bu grupta nükleazlara direnç ve mRNA bağlanma afinitesinde artış amacıyla molekülün 2' alkil modifikasyonları yapılmıştır. 2' metil ve 2' metoksietil modifiye edilmiş moleküller en sık çalışılan ikinci ASO grubudur (Şekil 3). Beklenen bir sonuç olarak yapılmış modifikasyonlar sonucu molekül RNaz H etkinliği taşımamaktadırlar. Bunun üstesinden gelebilmek amacıyla melez moleküller tasarlanmıştır. 5' ve 3' uçlarında 2' alkil modifiye 4-5 bazlık, orta kısmında ise yaklaşık 10 bazlık 1. jenerasyon özelliği taşıyan moleküllerin nükleaz direnç özelliği azalmadan RNaz H aracılı etki göstermesi sağlanmıştır[13-16].



Şekil 3. "2. Kuşak ASO" örneği olarak 2'-O-Metil RNA ve 2'-O-metoksietil RNA.

3. Kuşak ASO

Bu gruptaki moleküllerde afinite artırımı ve nükleaz direncini sağlayabilmek için furanoz halkasında modifikasyonlar yapılmıştır. Bu grubun üyelerinden peptid nükleik asitler (PNA) fosfodiester belkemiği psödopeptid polimeriyle yer değiştirmiştir (Şekil 3). Nükleazlardan etkilenmeyen, RNaz H etkinliği bulunmayan ancak sterik engellemeyi etkin şekilde yapabilen, oldukça istikrarlı moleküllerdir. Nötr elektriksel yükleri nedeniyle moleküllerin negatif yüklü RNA moleküllerine bağlanma sırasında daha az elektriksel itme kuvvetiyle karşılaşması etkinlikleri artırmıştır[17].



Şekil 4. "3. Kuşak ASO" yapıları.

Kilitli nükleik asitler (Locked nucleic acid-LNA) bu kuşağın bir başka üyesidir. Modifikasyonlar hedeflerine olan afiniteyi artırmış, nükleazlara direnç katmış ve oluşan heterodupleks yapıya termal stabilite kazandırmıştır. Ancak bu gruba ait moleküllerin de RNaz H aracılı aktivitesi bulunmamaktadır[18-20]. Fosforoamidat morfolino oligomerleri (PMO) bu kuşaktaki diğer moleküllerden biridir. Nötr elektrik yükü aktiviteyi artırmıştır. Bu oligomerler de RNaz H aracılı etkinlik göstermezler, gen susturumu işlevlerini sterik engelleme aracılığıyla yaparlar[21,22].

ASO'ların hücre içine hedeflenmeleri

Çeşitli modifikasyonlarla bağlanma afiniteleri ve nükleazlara dirençleri artırılmış olsa da ASO'ların hücre içinde istenilen seviyelere ulaşamadıkları belirlenmiştir. Çeşitli stratejiler ile bu zaaf giderilmeye çalışılmıştır.

Mikroinjeksiyon ve elektroporasyon gibi mekanik yöntemlerin ASO'ların hücre içerisine alınmasında kullanılabileceği düşünülmüş ve in-vitro koşullarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak bu yöntemlerin canlı sistemler üzerine uygulanabilmesi ve in-vivo araştırmaların yapılabilmesi pek olası görünmemektedir. Bu nedenle farklı alternatiflerin daha uygun olduğu düşünülmektedir[23].

Membran penetran peptidler ("cell penetrating peptides"-CPP) ile konjuge edilmek suretiyle ASO'lar hücre içine hedeflenmiştir. Böylece

geçirgenlik ve etkide artış elde edilmeye çalışılmıştır. CPP'ler 30 amino asitten kısa peptid zincirleridir. Bu moleküllerin kullanımında hedeflenecek molekül ile kimyasal konjugasyon yapılabileceği gibi, moleküle stabil bir kompleks oluşturarak da etkinlik sağlanabilir. Amfipatik özellikleri sayesinde membrandan geçiş özelliğine sahip moleküller olan bu peptid zincirlerinin membrandan geçiş mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, en sık tercih edilen yöntemlerden biridir. İlk olarak 1998 yılında Good ve ark.[24] tarafından denenen peptid modelleri uygulanacak molekül ve bakteri türüne göre değişiklik göstermektedir.

Veziküler taşıyıcı sistemler, uzun yıllardır ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Bu sistemlerin ASO moleküllerinin hedeflenmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Lipozomlar bu sistemlerin en bilinen örneklerinden biridir. Sferik lipit yapılar olan lipozomların boyutları mikrometre ile nanometre arasında değişkenlik gösterebilir. İstenilen pek çok farklı tipte molekülü hedef bölgeye metabolik yolaklardan etkilenmeden taşıyabilmesi, hücresel membranları taklit edebilir yapısı, biyolojik sistemlere uyumlu karakter göstermeleri gibi avantajları sayesinde ASO uygulamalarında çalışılmış yöntemlerdendir[25].

Bir başka taşıyıcı sistem olan niozomlar, uzun yıllardır ilaç ve gen taşıyıcı sistem olarak kullanılmakta olan lipozomlar ile kıyaslandığında lipozomların stabilite sorunları ve daha pahalı olması nedeniyle tercih edilmektedir[26]. Niozomlar antineoplastik, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar ajanlar, kozmetik preperatlar, peptid- proteinler ve antisens oligonükleotidler için taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır[27]. Antisens oligonükleotidler sorbiton monoester ve polisorbat katyonik niozomları ile Cos-7 ve HeLa hücreleri içerisine etkin bir şekilde taşınmış ve istenen gen baskılanması başarıyla sağlanmıştır[28-31].

Antibakteriyel ASO'lar

ASO'lar ile genlerin susturulması ve çeşitli proteinlerin oluşumlarının engellenmesi sayesinde bu moleküllerin mikrobiyolojide etkenin eradikasyonu için kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla bakteri üreme ve gelişmesi için gerekli olan biyokimyasal yolaklardaki esansiyel genlerin inhibisyonu yapılarak, antibakteriyel etki gösterebilecek ASO molekülleri üzerine araştırmalar yapılmıştır[9].

Greenberg ve ark.[32] tarafından yapılan çalışmada, *Burkholderia cepacia* complex bakterisinde, açil taşıyıcı protein geni antisens hedef olarak belirlenmiş ve lipid biyosentezi için esansiyel proteini kodlayan bu genin antisens mekanizmayla susturulmasıyla bakteri üremesi engellenmeye çalışılmıştır. Kontrol amaçlı olarak hiçbir geni hedef almayan diziler kullanılmıştır. ASO'ların peptid konjugasyonu ile yapılan denemelerde MİK değerlerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca konjuge edilen peptidin de etkinlikte değişiklik yaratabileceği saptanmıştır.

2014 yılında çoklu ilaç direnci (ÇİD) gösteren *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 3. kuşak ASO olan PNA dizileri peptid ile konjuge edilerek kullanılmış ve DNA giraz A (gyrA) geni hedef alınmıştır. Çalışma sonucunda anti-gyrA PNA'ların gen ifadesini etkili şekilde inhibe ettiği ve bakterinin büyümesini engellediği tespit edilmiştir. Yine PNA yapısındaki antisens oligonüleotitler kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde esansiyel genler hedef alınmıştır. Oldukça az konsantrasyonda bile bakterisidal etkinlik gösteren diziler tespit edilmiştir. mRNA ifadesindeki azalma düzeyleri ile veriler desteklenmiştir[33]. Mellbye ve ark.[34] yaptığı bir başka çalışmada, ise katyonik karakter göstermesi sağlanan PMO molekülleri, CPP ile *Escherichia coli* üzerine hedeflenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *acpP*

geni hedefleyen diziler ile kontrol amaçlı olarak kullanılan ampisiline yakın MİK değerleri elde edilmiştir. Ayrıca dizilerin katyonik hâle getirilmesinin negatif yük karakteri gösteren RNA moleküllerine bağlanmayı artırabileceği de ortaya konmuştur.

Wang ve ark.[35] tarafından yapılmış, direnç mekanizmalarının gen susturma yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, fosforotioat oligonükleotidler, lipozomal formülasyon ile bakterilere uygulanmış ve gen ifade düzeyleri moleküler tekniklerle araştırılmıştır. Direnç sağlayan genin inhibisyonu başarıyla sağlanmış, kökenlerin daha önce direnç gösterdikleri antibiyotiklere karşı MİK değerlerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Meng ve ark.[36] yaptığı çalışmada, lipozom içerisinde taşınan fosforotioate oligomerleri ile *mecA* geni susturulmaya çalışılmıştır. Yüksek derecece korunmuş bir bölge olan ve metisilin direncinden sorumlu olan bu genin hedef alınmasıyla, izolatların beta laktam antibiyotiklere daha duyarlı hâle gelmesi, oksasilinle tamamen inhibe edilebilmesi sağlanmıştır.

ASO'ların esansiyel bakteriyel genlerin susturulması sayesinde antibakteriyel etkinliklerini araştıran ve ortaya koyan pek çok çalışma bulunmaktadır. Bununla beraber, farklı hastalıklarda etkin olan proteinlerin inhibe edilmesini olası kılması, bu moleküllerin antiviral, immünolojik hastalıklar ve kanser[37,38] gibi pek çok alanda etkinliklerini inceleyen çalışmaların ortaya çıkmasına katkıda bulunmuştur.

Sonuç

Antibiyotik direncini giderek arttığı günümüzde farklı alternatiflerin enfeksiyon tedavisindeki potansiyelleri pek çok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Farklı mekanizmalar ile etki gösterebilmeleri nedeniyle antibiyotik direnç mekanizmalarından etkilenmeyen bu yöntemlerden birinin antisens antibakteriyel moleküller olacağı düşünülmektedir. Uygun genleri hedef alan, doğru yöntemlerle hücre içine aktarımı sağlanan ASO'ların bakterilerin üremesini inhibe eden, direnç genlerini susturmaya yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte, enfeksiyon tedavisindeki potansiyellerini, farmakokinetik, farmakodinamik ve toksikolojik açıdan da değerlendirecek multidisipliner çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Livermore DM.** Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(Suppl 1):S29-36. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp255
2. **Johnsen PJ, Townsend JP, Bøhn T, Simonsen GS, Sundsfjord A, Nielsen KM.** Factors affecting the reversal of antimicrobiol-drug resistance. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:357-64. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70105-7
3. **Watson JD, Crick FHC.** A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171:737-8. http://dx.doi.org/10.1038/171737a0
4. **Chan JH, Lim S, Wong WS.** Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33:533-40. http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04403.x
5. **Stephenson ML, Zamecnik PC.** Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:285-8. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.75.1.285
6. **Warren TK, Shurtleff AC, Bavari S.** Advanced morpholino oligomers: A novel approach to antiviral therapy. *Antiviral Res* 2012; 94:80-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.004
7. **Singh J, Kaur H, Kaushik A, Peer S.** A review of antisense therapeutic interventions for molecular biological targets in various diseases. *Int J Pharmacol* 2011; 7:294-15. http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2011.294.315
8. **Kurreck J.** Antisense technologies. Improvement through novel chemical modification. *J Biochem* 2003; 270:1628-44. http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x
9. **Bai H, Luo X.** Antisense Antibacterials: From Proof-Of-Concept to Therapeutic Perspectives. In: Bobbarala V. ed. A Search for Antibacterial Agents. 1th ed. Rijeka, InTech, 2012: 319-44. http://dx.doi.org/10.5772/33347
10. **Ekcstein F.** Phosphorotihoate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is uniqe about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10:117-21. http://dx.doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.117
11. **Crooke ST.** Progress in antisense technology: The end of beginning. *Methods Ezymol* 2003; 313:3-45. http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(00)13003-4
12. **Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH.** Chemical

modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2005; 10:587-93.
http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03426-4

13. **Altmann KH, Fabbro D, Dean NM, et al.** Second-generation antisense oligonucleotides: Structure-activity relationships and design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans* 1996; 24:630-7.
http://dx.doi.org/10.1042/bst0240630
14. **Dean NM, Bennet CF.** Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 2003; 22:9087-96.
http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207231
15. **Crooke ST.** Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004; 55:61-95.
http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.55.091902.104408
16. **Turner JJ, Fabani M, Arzumanov AA, Ivanova G, Gait MJ.** Targeting the HIV-1 RNA leader sequence with synthetyc oligonucleotides and siRNA: chemistry and cell delivery. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758, 290-300
17. **Nielsen PE.** PNA technology. *Mol Biotechnol* 2003; 26:233-48.
http://dx.doi.org/10.1385/MB:26:3:233
18. **Simões-Wüst AP, Hopkins-Donaldson S, Sigrist B, Belyanskaya L, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U.** A functionally improved locked nucleic acid antisense oligonucleotide inhibits Bel-2 and Bel-xL expression and facilitates tumor cell apoptosis. *Oligonucleotides* 2004; 14:199-209.
http://dx.doi.org/10.1089/1545457042258297
19. **Fluiter K, Frieden Ö, Vreijling J, et al.** On the in vitro and in vivo properties of four locked nucleic acid nucleotides incorporated into an anti-H-Ras antisense oligonucleotide. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 16:959-66.
http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200400419
20. **Stein CA, Hansen JB, Lai J, et al.** Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:e3.
http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp841
21. **Arora V, Devi GR, Iversen PL.** Neutrally charged phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers: uptake, efficacy and pharmacokinetics. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5:431-9.
http://dx.doi.org/10.2174/1389201043376706
22. **Iversen P.** Morpholinos. In: Crooke ST eds. Antisense drug technology: principles, strategies, and applications. 2nd ed. Boca Raton FL CRC Press, 2008:375-88.
23. **Gupta S, Singh RP, Rabadia N, Patel G, Panchal H.** Antisense technology. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2011; 7:38-45.
24. **Good L, Nielsen PE.** Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:2073-6.
http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.5.2073
25. **Alhariri M, Azghani A, Omri A.** Liposomal antibiotics for the treatment of infectious disease. *Expert Opin Drug Deliv* 2013; 10:1515-32.
http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2013.822860
26. **Vyas SP, Khar RK.** Targeted and Controlled Drug Delivery Novel Carrier Systems. 1th ed. New Delhi; CBS Publishers and Distributors 2011: 249-79.
27. **Sankhyan A, Pawar P.** Recent trends in niosome as vesicular drug delivery system. *JAPHAC* 2012; 2:20-32.
28. **Huang YZ, Gao JQ, Chen JL, Liang WQ.** Cationic liposomes modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006; 49:158-64.
http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.014
29. **Huang YZ, Han G, Wang H, Liang WQ.** Cationic niosomes as gene carriers: preparation and cellular uptake in vitro. *Pharmazie* 2005; 60:473-4.
30. **Huang YZ, Rao Y, Chen JL, Yang VC, Liang W.** Polysorbate cationic synthetic vesicle for gene delivery. *J Biomed Mater Res A* 2011; 96:513-9.
http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32999
31. **Huang Y, Chen J, Chen X, Gao J, Liang W.** PEGylated synthetic surfactant vesicles (Niosomes): novel carriers for oligonucleotides. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19:607-14.
http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3193-4
32. **Greenberg DE, Marshall-Batty KR, Brinster LR, et al.** Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers targeted to an essential gene inhibit *Burkholderia cepacia* complex. *J Infect Dis* 2010; 201:1822-30.
http://dx.doi.org/10.1086/652807
33. **Wang H, He Y, Xia Y, Wang L, Liang S.** Inhibition of gene expression and growth of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by antisense peptide nucleic acids. *Mol Biol Rep* 2014; 41:7535-41.
http://dx.doi.org/10.1007/s11033-014-3643-2
34. **Mellbye BL, Weller DD, Hassinger JN, et al.** Cationic phosphorodiamidate morpholino oligomers efficiently prevent growth of *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:98-106.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp392
35. **Wang H, Meng J, Jia M, et al.** oprM as a new target for reversion of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 60:275-82.
http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00742.x
36. **Meng J, Wang H, Hou Z, et al.** Novel anion liposome-encapsulated antisense oligonucleotide restores susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rescues mice from lethal sepsis by targeting mecA. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2871-8.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01542-08
37. **Galletti R, Masciarelli S, Conti C, et al.** Inhibition of Epstein Barr Virus LMP1 gene expression in B lymphocytes by antisense oligonucleotides: Uptake and efficacy of lipid-based and receptor-mediated delivery systems. *Antiviral Res* 2007; 74:102-10.
http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.09.001
38. **Orfanelli U, Jachetti E, Chiacchiera F, et al.** Antisense transcription at the TRPM2 locus as a novel prognostic marker and therapeutic target in prostate cancer. *Oncogene* 2015; 34:2094-102.
http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.144

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(2):58-62, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.058

Araştırma

Human Papillomavirusun L1 Gen Bölgesinin Klonlanması ve Açıklatılması

Yasemin BULUT, Zülal AŞÇI TORAMAN, Adnan SEYREK
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Bu çalışmada, human papillomavirusun (HPV) yüksek patojenik genotiplerinin (HPV 16 ve HPV 18) L1 gen bölgesinin klonlanması ve prokaryotik sistemde açıklatılması rapor edilmiştir.*

Gereç ve Yöntem: *Öncelikle, HPV 16 ve 18 DNA pozitif doku örneklerinden HPV DNA'ları izole edildi. Daha sonra, L1 gen kısmı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı ve pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid vektörde klonlandı. Bu vektörler Escherichia coli'ye transforme edildi ve transforme bakteri hücreleri ampisillin içeren vasata selekte edildi.*

Bulgular: *Transforme E. coli hücrelerinden elde edilen rekombinant vektörlerde L1 geni varlığı restriksiyon enzim analizi ve PCR-tarama testleri ile belirlendi. Ampisillin içeren vasat ortamında üretilen his-işaretli L1 proteinleri pürifiye edildi. Pürifiye rekombinant L1 proteinleri sodyum dodesilsülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile belirlendi.*

Sonuç: *Bu çalışma ile elde edilen HPV L1 proteininin aşı olarak kullanımı potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle bu proteinin ökaryotik sistemde açıklatılması ve aşı çalışmaları planlamaktayız.*

Anahtar kelimeler: *Ekspresyon, Human papillomavirus, HPV, klonlama*

SUMMARY

Cloning and Expression of L1 Gene Region of Human Papillomavirus

Aim: *In this study, cloning and prokaryotic expression of L1 gene region of highly pathogenic genotypes (HPV 16 and HPV 18) of human papillomavirus (HPV) were reported.*

Materials and Methods: *Initially, HPV DNAs were isolated from HPV 16 and 18-positive tissue samples. Later, amplification of L1 gene of HPV was carried out by polymerase chain reaction (PCR). The amplified product of L1 gene was cloned into the pH6HTC His6HaloTag® T7 plasmid vector. The recombinant plasmid was used in transforming Escherichia coli. The transformed bacterial cells were selected onto ampicillin containing media.*

Results: *The recombinant vectors obtained from the transformed E. coli cells were subjected to restriction endonuclease and PCR-screening analysis in order to confirm the identity of L1 gene. The his-tagged L1 proteins synthesized onto the media containing ampicillin were purified. The purified recombinant L1 proteins were detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).*

Conclusion: *The L1 protein obtained from this study is a potential vaccine. Therefore, we are planning for the expression of this protein in eukaryotic system and vaccine studies.*

Key words: *Expression, Human papillomavirus, HPV, cloning*

GİRİŞ

Human papillomavirus (HPV), *Papillomaviridae* ailesinde yer alan, çift iplikli sirküler DNA'ya sahip ve 50-55 nanometre büyüklüğünde ikosahedral kapsid yapıda zarfsız bir virustur[1].

HPV epitelyotropik bir virus olup deri ve mukozalarda genellikle papillomatöz ile hiperplastik lezyonlara neden olur. HPV'nin yol açtığı lezyonlar genellikle lokalize olup, kendiliğinden iyileşir veya belirtisiz latent enfeksiyonlar oluşur. Ancak belli HPV tipleri kanser gelişiminde kofaktör olarak rol oynar. Günümüzde HPV özellikle serviks, anogenital bölge, deri, üst solunum ve üst sindirim yolları kanserlerinde

Alındığı tarih: 14.06.2016
Kabul tarihi: 03.08.2016
Yazışma adresi: Yasemin Bulut, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ
e-posta: ybulut@firat.edu.tr

saptanmış onkojenik bir DNA virusu olarak değerlendirilmektedir[2,3].

HPV'ler L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak sınıflandırılmaktadır[4]. Bu sınıflandırmaya göre 120'den fazla HPV genotipi belirlenmiştir. En son yapılan gruplandırmada HPV genotipleri onkojenik potansiyellerine göre 3 gruba ayrılmıştır[5]. Bunlar düşük, orta ve yüksek riskli HPV gruplarıdır.

Yüksek riskli gruptaki viruslar, servikal invaziv karsinomda en sık belirlenen tiplerdir. HPV tip 16, 18, 45, 56 ve 58 bu grupta yer almaktadır. HPV 16 ve HPV 18 servikal skuamöz hücreli karsinom ile ilişkili iken, servikal adenokarsinomlarla HPV 18 daha çok ilişkili bulunmuştur. Serviks kanserlerinde tespit edilen HPV tiplerinin yaklaşık %80'sinde HPV 16 ve HPV 18 belirlenmiştir. Bu nedenle HPV tipleri içerisinde HPV 16 ve HPV 18 en önemli tipler olarak değerlendirilmektedirler. Günümüzde HPV enfeksiyonuna yönelik en etkin mücadele HPV'nin yüksek patogenik genotiplerinin L1 gen bölgesinde açıklatılan rekombinant proteinin aşı olarak kullanılmasıdır[6].

Bu çalışmanın amacı HPV'nin yüksek patojenik genotipleri olan HPV 16 ile HPV 18'in L1 gen bölgesinin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak klonlanması ve açıklatılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

DNA Örnekleri

Çalışmanın başlangıç materyalini daha önceki çalışmalarımızda HPV enfekte olduğu tespit edilen dokularda elde edilen ve -80ºC'de tutulan HPV pozitif DNA örnekleri oluşturdu[7].

İnzört Geninin Çoğaltılması

HPV tip 16 ve 18 olduğu belirlenen DNA örnekleri ile proofreading polymerase (PromegaCo., ABD) ve EcoRI-XhoI restriksiyon enzim tanıma bölgelerini de bulunduran primerler (Tablo 1) kullanılarak yaklaşık 1500 baz çifti uzunlukta ürünler elde edildi.

Tablo 1. İnzört genin çoğaltılmasında kullanılan primerler.

HPV 16 Primerleri	HPV 18 Primerleri
Sense Primer; 5'GCTGAATTCAATATGC(G) AGGTGACTTTTTATTTA-3'	***Sense Primer;*** 5'-GCTGAATTCAATATGGCCTGT ATACACGGGTC-3'
Anti-sense Primer; 5'GGTCTCGAGACATTACA GCTTACGTTT-3'	***Anti-sense Primer;*** 5'GGTCTCGAGACA TTACTTC (G)CTG GCAC-3'

Polimeraz zinciri reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılan L1 geni %1'lik low-melting agaroz jelde ultra violet ışık kaynağında görüntülendi. Genleri içeren agaroz jel bölgesi steril bistüri ile kesilerek mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Jeldeki DNA'lar GENECLEAN® II (MP Biomedicals, Kaliforniya, ABD) ile yüksek miktarda ve temiz ürünler olarak elde edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı[8,9].

Klonlama

PCR ile amplifiye edilen ve -80°C'de tutulan HPV L1 gen bölgeleri pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid vektöre (PromegaCo., ABD) yerleştirildi. Bu amaçla, EcoRI enzimi ile kesilen plazmid DNA ile insört genlerin ligasyonu 2X Rapid Ligation Buffer içinde T4 DNA Ligase enziminin olduğu ortamda gerçekleştirildi. Rekombinant plazmidlerin transformasyonları amacıyla soğuk $CaCl_2$ içeren ortamda high-efficiency competent hücreler (*E. coli* JM109 kompetent hücreler) kullanıldı. Transforme hücreler 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar pleytlerinde üretildi. Klonlama işlemini takiben rekombinant plasmid vektörlerin belirlenmesi, ampisilin dirençli klonların seçim yöntemine ilave olarak, PCR tarama (PCR screening method)

ve EcoRI-XhoI restriksiyon enzim kesimi metotları kullanılarak gerçekleştirildi[8,9].

Rekombinant L1 proteininin üretimi

Rekombinant plazmid transforme *E. coli* JM109 kompetent hücreleri 37°C'de, sallayıcının bulunduğu ortamda LB besiyerinde bir gece için üretime bırakıldı. Bu süre sonunda LB besiyeri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı farklı bir kapta toplandı. Elde edilen bu üst sıvıda His6HaloTag protein pürifikasyon sistemi (PromegaCo., ABD) kullanılarak histidin işaretli L1 proteinlerin pürifikasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ürünlerin bir kısmı, üretim ve pürifikasyonun başarısının doğrulanması amacıyla, sodyum dodesilsülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile test edildi[9].

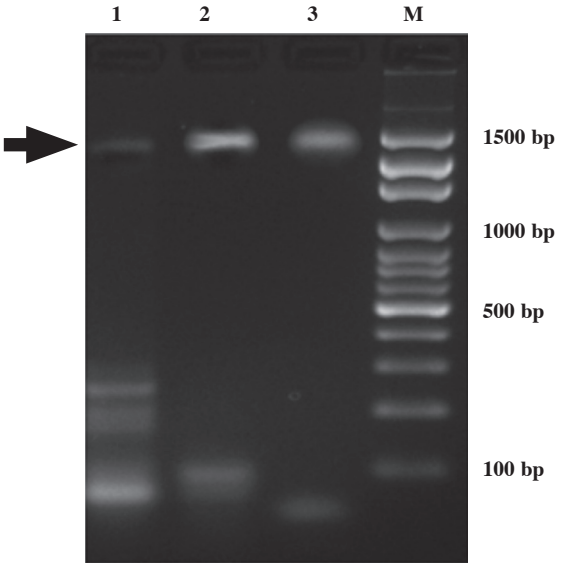
SDS-PAGE

Üretim ve pürifikasyonun başarısının doğrulanması üretilen rekombinant proteinlerin SDS-PAGE'de göçü ve görüntülenmesi ile sağlandı. Bu amaçla bir önceki adımda elde edilen pürifiye proteinler lizis solusyonu ile parçalandı. Daha sonra, proteinler Laemmli'nin aralıklı SDS-PAGE sistemi kullanılarak %5'lik yığımlayıcı ve %10'lik ayırıcı jelde, vertikal elektroforez cihazında molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıldı[9].

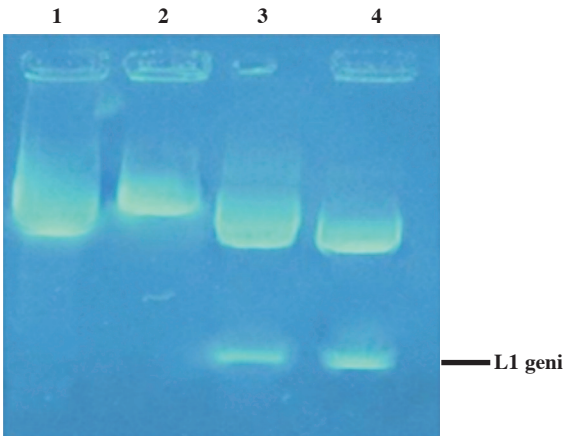
BULGULAR

HPV tip 16 ve 18 olduğu belirlenen DNA örnekleri kullanılarak insört DNA'lar PCR ile sentez edildi. PCR ile çoğaltılan insört L1 geni %1'lik agaroz jelde ultraviolet ışık kaynağında görüntülendi (Şekil 1).

HPV L1 gen bölgesini içeren rekombinant vektöre ile transforme *E. coli* hücrelerinden elde edilen DNA'ların doğrulanması için EcoRI-XhoI restriksiyon enzim analizi gerçekleştirildi (Şekil 2).

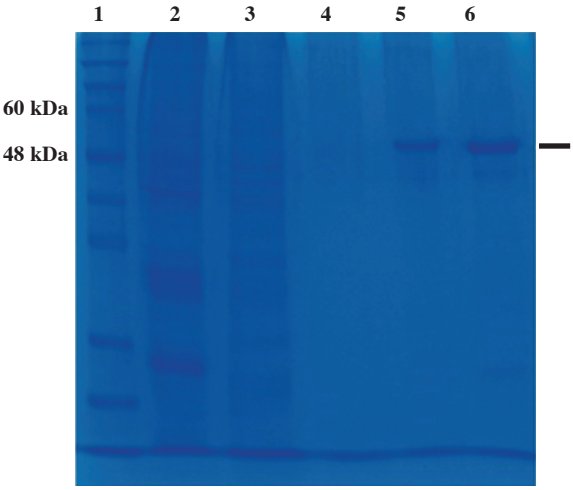


Şekil 1. HPV pozitif doku örneklerinde amplifiye edilen L1 gen bölgesinin %1'lik agaroz jelde görüntüsü. Hat 1 ve 3; HPV-16 pozitif doku örneklerinde çoğaltılan L1 gen bölgesi, Hat 2; HPV-18 pozitif doku örneklerinde çoğaltılan L1 gen bölgesi, M; DNA marker.



Şekil 2. HPV L1 gen bölgesini içeren rekombinant plazmidin restriksiyon enzim analizi ile doğrulanması. Hat 1; pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid, Hat 2; L1 gen bölgesini içeren rekombinant pH6HTC His6HaloTag® T7 plazmid, Hat 3; HPV-16 L1 gen bölgesini içeren rekombinant plazmid, Hat 3; HPV-18 L1 gen bölgesini içeren rekombinant plazmid.

Rekombinant vektörle transforme edilen *E. coli* hücrelerinden açıklatılan ve pürifiye edilen L1 proteini %10'luk SDS-PAGE'de incelendi. Rekombinant vektörle transform *E. coli* üst sıvılarında pürifiye edilen proteinin "coomassie" mavisiyle boyanmasında bu proteinin yaklaşık 55 kDa büyüklüğe sahip olduğu belirlendi (Şekil 3, Hat 5 ve hat 6).



Şekil 3. SDS-PAGE görüntüsü. Hat 1; Protein marker, Hat 2; *E. coli* üst sıvı, Hat 3; Rekombinant vektörle transforme *E. coli* üst sıvısı, Hat 4; Kontrol *E. coli* pürifiye üst sıvısı, Hat 5 ve 6; Rekombinant vektörle transform ve pürifiye *E. coli* üst sıvısı.

TARTIŞMA

HPV ile serviks kanserleri arasındaki epidemiyolojik ilişkinin anlaşılmasından sonra bu virusa karşı aşıların üretilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. HPV in-vitro hücre kültürlerinde üretilebilen virus değildir. Bu nedenle HPV'ye karşı klasik zayıflatılmış veya inaktive aşıların geliştirilmesi olası olmamıştır. Zhou ve ark.[10], 1991 yılında ökaryotik hücrelerde HPV 16'nın kapsid proteinleri olan L1 ve L2 genini çoğaltarak VLP (virus-like partikül) sentezlemişler ve aşı çalışmalarının başlatılmasında önemli bir adım atmışlardır. Daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar VLP'yi saflaştırmışlar ve VLP'lerin morfolojik olarak doğal virionlara benzerlik göstermelerini belirlemişlerdir. Ayrıca bu VLP'lerin yüksek titrasyonda nötralizan antikor ve T hücre yanıtı oluşturabildiğini ispatlamışlardır[11-14]. Bu yapılar günümüzde birçok ülkede kullanılan koruyucu aşıların temelini oluşturmaktadır.

Günümüzde lisans almış olan ve birçok ülkede kullanımına izin verilen HPV 16 ve 18 L1 VLP'ler ile yapılan bivalan (Cervarix®) ve HPV 6, 11, 16 ve 18 L1 VLP'ler ile yapılan quadrivalan aşılardan (Gardasil®, Merck-Sanofi-Pasteur) ümit verici sonuçlar elde edilmiştir[15]. L1 proteinlerinden elde edilen bivalan HPV aşısının 27 aylık takip süresi içinde yeni enfeksiyonlara karşı %92 ve persistan enfeksiyonlara karşı %100 koruduğu saptanmıştır. HPV tip 6, 11, 16 ve 18 L1 VLP'lerinden rekombinant maya teknolojisi ile üretilmiş quadrivalan HPV aşısının HPV 16 ve 18 bağlantılı servikal intraepitelial neoplazi ("cervical intraepithelial neoplasia"; CIN)'den ve persistan enfeksiyonlardan %100, HPV 6, 11, 16 ve 18 bağlantılı CIN'den %99 ve external genital lezyonlardan %95 koruduğu tespit edilmiştir[16].

Gerçekleştirilen birçok çalışmada koruyucu aşılar neticesinde oluşan HPV antikorlarının doğal enfeksiyondan sonra şekillenen antikorlara göre en az sekiz kat daha yüksek titrede oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca oluşan bu antikorların uzun yıllar yüksek titrede seyrettiği belirlenmiştir[17,18].

Günümüzde HPV aşıları, FDA onayı ile birlikte, gelişmiş birçok ülkede bayanlara 11-12 yaş grubunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, daha önce aşı olmamaları durumunda, 26 yaşına kadar kullanılması önerilmektedir. Yirmi yedi yaşın üzerindeki kadınlara yapılması ise, olguların geç şekillenmesi ve maliyet hesaplamaları dikkate alınarak, tavsiye edilmemektedir[18]. Uygun şekilde yapılan bir aşılamadan sonra ise yaklaşık yedi yıla yakın yüksek ve koruyucu titrede antikorların oluştuğu kaydedilmiştir[19].

Ülkemizde, başta serviks kanserleri olmak üzere, üst solunum yolları ve gastroentestinal sistem kanser olgularında HPV'nin belirlenmesi ve genotiplendirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur[20-24]. İlimiz ve çevresinde tarafımızdan yapılan çalışmalarda solunum, gastrointestinal ve genital sistemlerin kanser olgularında HPV virusunun bu olgularda yüksek sıklıkla varlığı gösterilmiştir[7,23,24]. Gerek ülkemizde gerekse ilimiz ve çevresinde görülen kanser olgularının konu edildiği çalışmalarda HPV prevalansının yüksek olduğu belirlenmiştir[20-24].

Ayrıca, belirlenen HPV tiplerinin büyük kısmını HPV tip 16 ve 18 gibi yüksek patojenik tipler oluşturur[7]. Bu bakımdan, sunulan bu sonuçlar, mevcut projenin ülkemiz açısından gerekliliğini ve ileri taşınmasını açık olarak desteklemektedir.

Mevcut proje ile HPV'nin iki önemli genotipinin aşı olarak kullanılma potansiyeline sahip proteinini açıklatan L1 gen bölgesinin prokaryotik açıklatılması başarılmıştır. Bu bir ön çalışmadır ve aynı gen bölgesinin özellikle ökaryotik sistemde açıklatılması ile bu sistemde üretilecek proteinlerin aşı olarak kullanımı için gerekli olan çalışmalar devam ettirilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmaya finansman destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (FÜBAP TF.11.87 nolu proje) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **zur Hausen H.** Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288:F55-78. http://dx.doi.org/10.1016/0304-419x(96)00020-0
2. **Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC.** Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:260-5. http://dx.doi.org/10.1111/j.0904-2512.2004.00177.x
3. **Turazza E, Lape-a A, Sprovieri O, et al.** Low-risk human papillomavirus types 6 and 11 associated with carcinomas of the genital and upper aero-digestive tract. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:271-6. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0412.1997.tb07858.x
4. **de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27. http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033
5. **Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A.** Precancerous lesions of the cervix, In: Kurman RJ, Te Linde RW. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, Eds. 2nd ed, Springer-Verlag, New York, USA, 2002: 102-47.
6. **Mu-oz N, Bosch FX, Castellsagué X, et al.** Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111:278-85. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20244
7. **Korkmaz E, Bulut Y, Seyrek A, Özercan IH, Toraman ZA.** Üst solunum yolları malign lezyonlarında HPV Tip 16, 18, 31 ve 33 DNA prevalansının araştırılması. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30:305-8.
8. **Bulut Y, Doymaz MZ.** Hepatit B virus core antijeni (HBcAg) geninin *Escherichia coli*'de klonlanması. *Mikrobiyol Bul* 2001; 35:127-32.
9. **Bulut Y, Doymaz MZ.** Hepatit B virüsü HBcAg geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde eksprasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2003; 35:183-91.
10. **Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH.** Expression of vaccini a recombinant of HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185:251-7. http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(91)90772-4
11. **Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:12180-4. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.24.12180
12. **Brown DR, Bryan JT, Schroeder JM, et al.** Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radio-immunoassay titer. *J Infect Dis* 2001; 184:1183-6. http://dx.doi.org/10.1086/323645
13. **Evans TG, Bonnez W, Rose RC, et al.** A Phase I study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 2001; 183:1485-93. http://dx.doi.org/10.1086/320190
14. **Pagliusi SR, Teresa Aguado M.** Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004; 23:569-78. http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.046
15. **Goldie SJ, Grima D, Kohli M, et al.** A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinic impact of a prophylactic HPV 16/18 vaccine. *Int J Cancer* 2003; 106:896-904. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.11334
16. **Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al.** Efficacy of a bivalent L1 virus- like particle in prevention of infection with human papillomavirus type 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364:1757-65. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17398-4
17. **Hakim AA, Dinh TA.** World wide impact of the human papilloma virus vaccine. *Curr Treat Options Oncol* 2009; 10:44-53. http://dx.doi.org/10.1007/s11864-009-0094-4
18. **Pedersen C, Petaja T, Strauss G, et al.** Immunization of early adolescent females with human papillomavirus type 16 and 18 l1 virus-like particle vaccine containing AS04 adjuvant. *J Adolesent Health* 2007; 40:564-71. http://dx.doi.org/10.1016/j.jadohealth.2007.02.015
19. **MacKenzie D.** Will cancer vaccine get to all women? *New Sci* 2005; 12:34-38.
20. **Tezcan S, Ozgur D, Ulger M, et al.** Human papillomavirus genotype distribution and E6/E7 oncogene expression in Turkish women with cervical cytological findings. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15:3997-4003. http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.9.3997
21. **Akcali S, Goker A, Ecemis T, Kandiloglu AR, Sanlidag T.** Human papilloma virus frequency and genotype distribution in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14:503-6. http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.1.503
22. **Tuncer ZS, Boyraz G, Sahin N, Alp A.** Distribution of human papillomavirus types in Turkish women. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012; 33:204-6.
23. **Erol D, Bulut Y, Yüce H, Özercan IH.** Çeşitli gastrointestinal karsinom örneklerinde insan papillomavirus DNA varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43:259-68.
24. **Bulut Y, Önalan EE, Dilek AR, et al.** Serviksin sitolojik anomalilerinde human papillomavirus pozitifliği ve IL-10 promotör-1082 gen polimorfizmi, 3. Ulusal Viroloji Kongresi, Bursa, Türkiye 2007: 273.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(2):63-68, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.063

Araştırma

Son Üç Yılda Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları

Esra ÖZKAYA*, Ahmet ÇALIŞKAN, Özlem KİRİŞCİ**, Seray TÜMER*****

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

***Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı*

****Adana Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı*

ÖZET

Amaç: *Candida türleri, ciddi enfeksiyonlara yol açan fırsatçı patojenlerdir. Son yıllarda hastane kökenli mantar enfeksiyonlarında artış gözlenmekte olup, tüm hastane enfeksiyonlarının %5'inden Candida türlerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Kandidemilerde en sık etken Candida albicans'dır. Ancak albikans-dışı Candida türlerinin de görülme oranı giderek artmaktadır ve antifungallere duyarlılıkları birbirlerinden farklılık göstermektedir. Çalışmamızda Ocak 2013-Aralık 2015 tarihleri arasında laboratuvarımıza çeşitli klinik birimlerden gönderilen kan kültürlerinden izole edilen Candida türlerinin tanımlanması ve antifungal duyarlılık oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmamız süresince Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen tüm kan kültürü örnekleri incelenmiştir. Örnekler BACTEC/9050 (Becton Dickinson, Maryland, ABD) otomatize sisteminde inkübe edilmiştir. Maya izolatlarının tür düzeyinde identifikasyonu ve antifungal duyarlılıkları Vitek 2.0 Compact (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak saptanmıştır. İzolatlarının flukonazol, vorikonazol, flusitozin, amfoterisin B ve kaspofungine duyarlılık kategorileri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI M27-A3) standartlarına göre belirlenmiştir.*

Bulgular: *Çalışma süresince laboratuvarımıza toplam 8271 kan kültürü örneği gönderilmiştir. Gönderilen örneklerin 6419 (%77.6)'unda üreme saptanmamıştır. Elli hastaya ait 93 kan kültürü örneğinde Candida spp. üremesi görülmüştür. Kan kültürlerinde Candida spp. tespit edilen hastaların 2'si (%4.0) dâhiliye servisinde, diğerleri (%96.0) yoğun bakım ünitelerinde tedavi görmekteydi. İzolatların %62.0'ını Candida parapsilosis oluşturmaktadır. İkinci sıklıkta C. albicans (%34.0) saptanmıştır. Candida tropicalis ve Candida krusei türlerinden ise birer izolat (%2.0) bulunmuştur. Antifungal duyarlılık testlerinde flusitozine karşı hiç direnç saptanmamıştır. En düşük duyarlılık oranının (%74.2) C. parapsilosis izolatlarında vorikonazole karşı olduğu görülmüştür. C. albicans izolatlarında amfoterisin B'ye %94.1 oranında duyarlılık görülmüşken, test edilen diğer antifungal maddelere direnç bulunmamıştır.*

Sonuç: *Çalışmamızda, en sık yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürü örneklerinde Candida türleri saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda, en sık C. parapsilosis, ikinci sıklıkta ise C. albicans türü tespit edilmiştir. İzole edilen kandida türlerinin bazı antifungallere karşı dirençli olduğu görülmüştür. Bu durum, özellikle yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda, tür düzeyinde tanımlamasının ve antifungal duyarlılıklarının bildirilmesinin tanı ve tedavi takibinde oldukça önemli olduğunu düşündürmüştür.*

Anahtar kelimeler: *Antifungal duyarlılık, Candida türleri, kan kültürü*

SUMMARY

Distribution and Antifungal Susceptibilities of Candida Species Isolated from Blood Cultures at Kahramanmaraş Necip Fazıl City Hospital in the Last Three Years

Aim: *Candida species are opportunistic pathogens that cause serious infections. Recently, an increase is observed in hospital-acquired fungal infections; and Candida species are reported to be responsible for 5% of all nosocomial infections. Candida albicans is the most common cause of candidemia. However, the incidence of non-albicans Candida species has been increasing, and their antifungal susceptibilities are different from each other. In this study investigation of identification, and determination of antifungal susceptibility rates among Candida species isolated from blood cultures which were sent to our laboratory from various clinical units during January 2013-December 2015 were aimed.*

Material and Method: *In the context of this study, blood culture samples collected at Kahramanmaraş Necip Fazıl City Hospital were examined. Samples were incubated using BACTEC/9050 (Becton Dickinson, Maryland, USA) automated system. For the identification and antifungal susceptibility tests of Candida species, Vitek version 2.0 (BioMérieux, France) automated system was used. Fluconazole, voriconazole, flucytosine, amphotericin B and caspofungin susceptibility categories of the isolates were determined according to the criteriae of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A3).*

Results: *During our study period, 8271 blood cultures were analysed in the laboratory. Six thousand four hundred and nineteen (77.6%) cultures resulted as negative. Candida species were isolated from 93 blood cultures of 50 patients. Candida species were isolated from blood cultures.of two patients (4.0%) in internal medicine services, and other patients (96.0%) with Candida growth were treated in the intensive care units. Candida parapsilosis constituted 62.0% of isolates. C. albicans was detected in 34.0% of the cultures at the second frequency. Candida tropicalis and Candida krusei species were cultured from only one (2.0%) specimen, each. No resistance was detected in antifungal susceptibility tests of flucytosine. The least susceptibility rate was observed among C. parapsilosis isolates for voriconazole. Ninety four percent of C. albicans isolates showed susceptibility to amphotericin B, and no resistance to the other antifungal agents tested.*

Conclusion: *In conclusion, in our study Candida species were most frequently isolated from blood culture samples sent from the intensive care units. While the most frequent species isolated was C. parapsilosis, C. albicans was at the second frequency. Resistance to some of the antifungals tested was observed for some of the Candida species isolated. It was considered that identification and antifungal susceptibility tests are very important in the diagnosis and treatment of these infections in patients especially at intensive care units.*

Key words: *Antifungal susceptibility, Candida species, blood culture*

Alındığı tarih: 28.06.2016
Kabul tarihi: 05.08.2016
Yazışma adresi: Esra Özkaya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Tel: 90 462 3775155 **Faks:** +90 462 3775340
e-posta: esraozkaya@ktu.edu.tr

GİRİŞ

Candida türleri, ciddi enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı patojenlerdir[1]. Son yıllarda hastane kökenli mantar enfeksiyonlarında artış gözlenmekte olup, tüm hastane enfeksiyonlarının %5'inden *Candida* türlerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir[2].

Kandidemi, *Candida* türlerinin bir veya daha fazla kan kültüründen izole edilmeleri olarak tanımlanır. İnvazif kandidoz ise kandidemi ve yaygın kandidozla endokardit, menenjit, endoftalmit ve diğer iç organ tutulumlarının birlikteliğini gösterir[3]. Kandidemiler, invaziv kandida enfeksiyonlarının %50-70'ini oluşturur. Bununla birlikte, kandidemi ve invaziv kandidiyazin neden olduğu mortalite oranları %10-49 arasında değişmektedir[2]. İmmünsüpresif tedavi uygulamalarının artması, transplantasyon cerrahisinin yaygınlaşması, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımında artış, yoğun bakım ünitesi (YBÜ)'de kalma süresinin uzaması ve hastalara uygulanan invaziv işlemler mortalite oranlarında yükselmelere neden olmaktadır[4].

Kandidemilerde en sık etken *Candida albicans*'dır. Ancak *albicans*-dışı *Candida* türlerin de görülme oranı giderek artmaktadır[4]. Antifungal ajanların *Candida* türleri üzerine gösterdikleri etkiler farklılar göstermektedir. Bu nedenle uygun tedavi seçeneklerinin planlanmasında, kandidemi etkenlerinin belirlenmesi ve antifungal duyarlıklarının bilinmesi oldukça önemlidir[5].

Çalışmamızda, Ocak 2013-Aralık 2015 tarihleri arasında laboratuvarımıza çeşitli klinik birimlerden gönderilen kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanması ve antifungal duyarlılık oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Ocak 2013-Aralık 2015 tarihleri arasında 500 yataklı Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli klinik birimlerden gönderilen tüm kan kültürü örnekleri incelendi. Kan kültürü örnekleri BACTEC/9050 (Becton Dickinson, Maryland, ABD) otomatize sisteminde inkübe edildi. Üreme sinyali veren örneklere Gram boyama işlemi uygulandı. Ardından OR-BAK (Türkiye) firmasından satın alınan %5 koyun kanlı agar, Eosin Metilen Blue agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine ekilerek 35ºC'de 24-48 saat aerobik ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında üreyen maya görünümlü kolonilerden Gram boyama ve Sabouraud Dekstroz Agar besiyerine ekim yapıldı. Bu besiyerinde üreyen maya izolatlarının tür düzeyinde identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının saptanmasında Vitek 2.0 Compact otomatize sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanıldı. İzolatların flukonazol, vorikonazol, flusitozin, amfoterisin B ve kaspofungine duyarlılık kategorileri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI M27-A3) standartlarına göre belirlendi[6].

Aynı hastaya ait birden fazla izolat varsa çalışmaya dahil edildi. Ancak aynı hastadan tek bir yatış döneminde izole edilen ve aynı antifungal direnç profiline sahip olan örnekler çalışma dışı bırakıldı.

BULGULAR

Çalışma süresince laboratuvarımızda 50 hastaya ait 93 kan kültürü örneğinde *Candida* spp. üremesi saptandı. Kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin yıllara göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmektedir.

İzolatların %62.0'ı *Candida parapsilosis* idi; ikinci sıklıkta %34.0 oranlarıyla *C. albicans* saptandı. *Candida tropicalis* ve *Candida krusei*

Tablo 1. Kan kültüründen izole edilen *Candida* türleri ve yıllara göre üreme oranları.

	C. parapsilosis		*C. albicans*		*C. tropicalis*		*C. krusei*		*Toplam*	
Yıl	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
2013	1	50.0	1	50.0	-	-	-	-	2	100
2014	6	75.0	2	25.0	-	-	-	-	8	100
2015	24	60.0	14	35.0	1	12.5	1	12.5	40	100
Toplam	31	62.0	17	34.0	1	2.0	1	2.0	50	100

Tablo 2. Kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin klinik birimlerindeki üreme oranları.

	Klinik birimler													
			Yoğun Bakım Üniteleri											
	Dahiliye servisi		**Anestezi ve Reaminasyon**		**Dahiliye**		**Cerrahi**		**Nöroloji**		**Palyatif**		**Yanık**		**Toplam**	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C. parapsilosis	1	3.2	23	74.2	-	17.6	-	-	5	16.1	2	6.5			31	100.0
C. albicans	1	5.9	5	29.4	3	100.0	2	11.8	2	11.8	1	5.9	3	17.6	17	100.0
C. tropicalis	-		-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100.0
C. krusei	-		1	100.0	-		-	-	-	-	-	-	-	-	1	100.0

Tablo 3. Kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık oranları n(%).

	Antifungal madde n (%)				
Mikroorganizma	**Flukonazol**	**Vorikonazol**	**Flusitozin**	**Amfoterisin B**	**Kaspofungin**
C. parapsilosis (n=31)	29 (93.5)	23(74.2)	31 (100.0)	29 (93.5)	31 (100.0)
C. albicans (n=17)	17 (100.0)	17 (100.0)	17 (100.0)	16 (94.1)	17 (100.0)
C. tropicalis (n=1)	1*	1*	1*	1*	1*
C. krusei (n=1)	0*	1*	0*	1*	1*

**Yalnızca bir örnekte tespit edildiği için yüzdeleri belirtilmemiştir.*

türlerinden ise birer izolat (%2.0) bulundu.

Kan kültürlerinde *Candida* spp. tespit edilen hastaların 2'si (%4.0) dâhiliye servisinde, diğerleri (%96.0) YBÜ'de tedavi görmekteydi. *Candida* türlerinin klinik birimlere göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmektedir.

Antifungal duyarlılık testlerinde flusitozine karşı hiç direnç saptanmadı. En düşük duyarlılık oranı %74.2 ile *C. parapsilosis* izolatlarında vorikonazole karşı görüldü. *C. albicans* izolatlarında amfoterisin B'ye %94.1 oranında duyarlılık görüldü ama test edilen diğer antifungallere duyarlılık oranları %100 olarak tespit edildi. Yalnızca bir hastada tespit edilen *C. tropicalis* izolatı test edilen tüm antifungallere karşı duyarlı bulundu. Yine yalnızca bir hastada saptanan *C. krusei* izolatının ise flukonazole ve flusitozine dirençli iken, test edilen diğer antifungallere duyarlı olduğu görüldü. *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık oranları Tablo 3'te gösterilmektedir.

TARTIŞMA

Son yıllarda hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında *Candida* türleri gittikçe artan oranlarda saptanmaktadır ve bu durum özellikle immünsüprese hastalarda mortalite düzeylerini oldukça yükseltmektedir[1].

Kandidemilerde etken olarak en sık *C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata, C. tropicalis* ve

C. krusei izole edilmektedir[7]. Bununla birlikte, enfeksiyona neden olan türlerin çeşitliliği bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri, Kuzey ve Orta Avrupa'da en sık saptanan *Candida* türü *C. albicans* iken Asya, Güney Avrupa ve Güney Amerika'da non-*albicans* kandidemi daha sıktır[8]. Örneğin, Hindistan'da üçüncü basamak sağlık merkezlerinde yapılan çalışmalarda, *albicans*-dışı *Candida* dışı kandidemi oranı %50-96 arasında bulunmuştur[9]. Ülkemizdeki çeşitli merkezlerin kan kültürlerinde *Candida* türlerinin tespit oranları Tablo 4'te sunulmaktadır. Bu verileri incelediğimizde çalışmamızda, kan kültürlerinde üreyen *Candida* türleri arasında ilk sırada *C. parapsilosis* (%62.0) olması, *C. albicans*'ın ise %34.0 ile ikinci sırada yer alması dikkat çekmektedir. Sıralamasındaki bu farklılık 2015 yılında hastanemizin anestezi ve reaminasyon yoğun bakım (ARYB) ünitesinde görülen *C. parapsilosis* üremesindeki artıştan kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar bize ARYB ünitesinde bir salgın olasılığını düşündürmüştür. Bu olasılık göz önünde bulundurarak enfeksiyon kontrol komitesi ile görüşülmüş, el yıkama eğitimlerinin verilmesi, enfeksiyon kontrol önlemlerine uyumun arttırılması, uygun olmayan antibiyotik kullanımının engellenmesi, izolasyon kriterlerine uyulması gibi konularda görüşülerek gerekli önlemlerin alınması sağlanmıştır.

Yoğun bakım ünitelerindeki hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının %10-20'si *Candida* türlerinden kaynaklanmaktadır[7]. Bu ünitelerdeki santral venöz kateter kullanımı, endotrakeal entübasyon uygulaması, total parenteral nutrisyon ile beslenme, yoğun antibiyotik kullanımıı ve immünosupresif tedavi uygulamalarının kandidemi gelişimi açısından önemli risk faktörleri olduğu pek çok faklı çalışmada bildirilmektedir[1,7,15,16]. Yenigün Koçak ve ark.[2] çalışmalarında kandidemi olgularının %95,0'ını hastane kaynaklı olarak değerlendirmiş ve kandidemi olgularının %34.0'ını YBÜ'lerde tedavi alan hastaların oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Mutlu Sarıgüzel ve ark.[7] 175 izolatın 141'ini (%80.5) YBÜ'de, 29'unu (%16.5) dahili servislerde, beşini (%2.8) cerrahi servislerde yatan hastalardan izole etmişlerdir. Öztürk ve ark.[11] 36 izolatın 18 tanesini (%50.0) YBÜ'lerde, 13 tanesini (%36.0) cerrahi servisinde ve beş tanesini de (%14.0) dâhili birimlerde tedavi alan hastalarda izole etmişlerdir. Çalışmamızda da benzer durum gözlenmiştir. Hastalarımızın yalnızca ikisi dâhiliye servisinde tedavi olurken, geri kalanı (%96.0) çeşitli YBÜ'lerde takip edilmekteydi.

Mantar enfeksiyonunun sıklığının artması, ampirik antifungal kullanımının yaygınlaşmasına ve direnç oranlarının yükselmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla uygun ve etkili tedavinin planlanmasında in-vitro antifungal duyarlılık testlerine ihtiyaç duyulmaktadır[16]. Bu konuda CLSI ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) sıvı dilüsyon yöntemini referans yöntem olarak önermektedir[6,17,18]. Bu çalışmada, sonuçların referans

Tablo 4. Ülkemizdeki çeşitli merkezlerin kan kültürlerinde *Candida* türlerinin tespit oranları (%).

Yazar adı, Kaynak No	*C. albicans*	*C. parapsilosis*	*C. tropicalis*	*C. glabrata*	*C. krusei*	*C. guilliermondii*	*C. kefyr*
Çalışkan ve ark.[1]	57.0	14.0	14.0	10.0	-	5.0	-
Yenigün Koçak ve ark.[2]	55.2	28.9	-	2.6	2.6	2.6	-
Atalay ve ark.[4]	68.0	14.5	3.1	9.0	4.1	-	-
Mutlu Sarıgüzel ve ark.[7]	38.9	38.3	3.4	7.4	2.9	1.1	1.7
Gültekin ve ark.[10]	49.0	23.0	14.0	12.0	1.0	1.0	-
Öztürk ve ark.[11]	53.0	30.0	5.5	5.5	3.0	-	3.0
Sav ve ark.[12]	65.8	12.3	1.8	12.3	5.3	-	1.8
Berk ve ark.[13]	37.0	49.3	-	-	-	-	-
Ece G.[14]	6.7	66.6	-	16.7	-	-	-
Bu çalışma	34.0	62.0	2.0	-	2.0	-	-

yöntemle doğrulanamaması çalışmayı sınırlamaktadır. Ancak bu yöntem zaman alıcı ve çalışılması zahmetli olduğu için pratik yöntemler ön plana çıkmaktadır. Çalışmamızda sıvı dilüsyon yöntemi ile %90'dan fazla uyum gösteren tam otomatize Vitek 2.0 Compact maya duyarlılık sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanılarak antifungal duyarlılık testleri çalışılmıştır[19,20]. Çalışmamızda *C. albicans* izolatlarında amfoterisin B'ye %94.1 oranında duyarlılık görülmüşken, test edilen diğer antifungal maddelere direnç bulunmamıştır. Bizimle aynı yöntemi kullanarak kan kültürlerindeki *Candida* türlerinin varlığını tespit eden Çalışkan ve ark.[1] *C. albicans* izolatlarının %93.9'nun amfoterisin B'ye duyarlı olduğunu raporlamışlardır[1]. Mutlu Sarıgüzel ve ark.[7] ise *C. albicans* suşlarını amfoterisin B'ye %94.2, flukonazole %97.1 oranlarında duyarlı bulurken diğer antifungallere direnç saptamamışlardır. Bu çalışmada, en sık görülen izolat olan *C. parapsilosis* flukonazole %93.5, vorikonazole %74.2, flusitozine %100, amfoterisin B'ye %93.5, kaspofungine %100 oranlarında duyarlı bulunmuştur. Ece G'nin[14] yaptığı çalışmada da benzer şekilde kan kültürlerinde en sık *C. parapsiloisis* izole edilmiş ve flusitozine, flukonazole ve vorikonazole direnç saptamamıştır. Erdem ve ark.[16] *Candida* türlerine bağlı nozokomiyal enfeksiyonları inceledikleri çalışmalarında hiçbir izolatta vorikonazol direnci saptamazken, flukonazol direncini yalnızca doğal dirençli kabul edilen *C. krusei* izolatlarında görmüşlerdir. Çalışmamızda bir hastada izole edilen *C. krusei* izolatında da aynı durum söz konusudur.

Sonuç olarak, çalışmamızda kan kültürü örneklerinde en sık *C. parapsilosis* türü tespit edilmiştir. *C. albicans* ise ikinci sırada yer almıştır. İzole edilen kandida türlerinin bazı antifungallere karşı dirençli olduğu görülmüştür. Bu durum özellikle YBÜ'lerde tedavi alan hastalarda *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanmasının ve antifungal duyarlılıklarının bildirilmesinin tanı ve uygun tedavi planlanmasında oldukça önemli olduğunu düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Çalışkan E, Dede A, Biten Güven G.** Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2013; 27:25-30.
2. **Yenigün Koçak B, Kuloğlu F, Doğan Çelik A, Akata F.** Bir üçüncü basamak hastanesinde erişkin kandidemi olgularının epidemiyolojik özellikleri ve risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:489-503.
3. **Akalın H.** Kandidemilerde risk faktörleri ve risk değerlendirmesi. *ANKEM Derg* 2008; 22:270-4.
4. **Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN.** Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin B ve flukonazole in v itro duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Derg* 2012; 28:149-51.
5. **Temiz H, Temiz S, Kaya Ş.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Okmeydanı Tıp Derg* 2015; 31:13-7. http://dx.doi.org/10.5222/otd.2015.013
6. **CLSI.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 3rd ed, M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
7. **Mutlu Sarıgüzel F, Koç AN, Karagöz S.** Kan kültürlerinden izole edilen maya türlerinin Vitek 2 sistemi ile tanımlanması ve antifungal duyarlılıkları. *Harran Univ Tıp Fak Derg* 2015; 12:261-8.
8. **Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ.** Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010; 14:e954-66. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.04.006
9. **Tak V, Mathur P, Varghese P, Gunjiyal J, Xess I, Misra MC.** The epidemiological profile of candidemia at an Indian trauma care center. *J Lab Physicians* 2014; 6:96-101. http://dx.doi.org/10.4103/0974-2727.141506
10. **Gültekin B, Eyigör M, Telli M, Aksoy M, Aydın N.** Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *ANKEM Derg* 2010; 24:202-8.
11. **Öztürk T, Özseven AG, Sesli Çetin E, Kaya S.** Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe Tıp Derg* 2013; 14:17-22.
12. **Sav H, Demir G, Atalay MA, Koç AN.** Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2013; 70:175-80. http://dx.doi.org/10.5505/TurkHijyen.2013.37267
13. **Berk E, Kayman T, Sarıgüzel FM, Koç AN, Sav H, Çelik İ.** Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri ve antifungal duyarlılıkları. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı, (3-7 Kasım 2012, Aydın) P027: 227.
14. **Ece G.** Distribution of Yeast-Like fungi at a university hospital in Turkey. *Jundishapur J Microbiol* 2014;

7:e13141.
http://dx.doi.org/10.5812/jjm.13141

15. **Zhang XB, Yu SJ, Yu JX, Gong YL, Feng W, Sun FJ.** Retrospective analysis of epidemiology and prognostic factors for candidemia at a hospital in China, 2000-2009. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65:510-5.
http://dx.doi.org/10.7883/yoken.65.510
16. **Erdem F, Tuncer Ertem G, ve ark.** Candida türlerine bağlı nozokomiyal enfeksiyonların epidemiyolojik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46:637-48.
17. **CLSI.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement. M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
18. **Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, et al.** EUCAST Definitive Document EDef7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:398-405.
http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01935.x
19. **Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S, Bousquet PJ, Rispail P, Lachaud L.** Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. *J Clin Microbiol* 2010; 48:154-61.
http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01096-09
20. **Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG.** Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77:37-40.
http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.019

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(2):69-75, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.069

Araştırma

Candida albicans'ın Salgısal Asit Proteinaz Etkinliğinin Araştırılmasında In Vivo Model Olarak *Galleria mellonella* Larvanın Kullanılması§

Ali ALVANDİAN*, Mohamad Hasan JAWADİ, Zeynep Nur ALTINTAŞ**, Naci YILDIZ**, Meral KARAMAN***

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

***Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dönem 2 Öğrenci Çalışma Modülü Grubu*

ÖZET

Amaç: *Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin araştırılmasında, fare-sıçan modelleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Tıbbi öneme sahip birçok mikroorganizmanın model konakçısı olarak Galleria mellonella larva kullanımı literatürde kabul görmüştür. Bu çalışmada, Candida albicans'ın salgısal asit proteinaz (SAP) enzim aktivitesinin, konakçı modeli olarak G. mellonella larva üzerindeki etkileri araştırılmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Enfeksiyon modeli için, salgısal asit proteinaz (SAP) enzim aktivitesi sığır serum albümin agar yöntemi ile olumlu ve olumsuz olarak bulunan iki klinik C. albicans kökeni kullanıldı. Son larval evrede, 2-3 cm uzunluğunda, 250-300 mg ağırlığında, sağlıklı G. mellonella larvalar dört gruba ayrıldı; kontrol, "sham" (fosfat tampon), SAP olumlu ve SAP olumsuz ($5x10^5$ CFU/ml) C. albicans ile enfekte grup. İnokulasyon sonrası larvalar 37ºC'de bekletildi. Doksan altı saat sonra sağlık durumları skorlandı, sakrifiye edildi ve fungal yük araştırıldı.*

Bulgular: *Larvalar aktivite, yaşamda kalma, melanizasyon ve fungal yük açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu saptandı. Kontrol ve "sham" gruplarında ölüm ve melanizasyon gözlenmezken, 96. saat sonunda patojen üremesi de saptanmadı. SAP olumlu ve olumsuz gruplar arasında fungal yük, melanizasyon ve toplam sağlık skoru açısından anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$).*

Sonuç: *Çalışmamızda, C. albicans'ın SAP enzim aktivitesinin virülansta rol oynadığı G. mellonella larva modelinde gösterilmiştir. Fungal enfeksiyonların ve SAP gibi virülans faktörlerinin konak hücreye etkilerinin araştırılmasında G. mellonella larva modelinin güvenilir, uygulaması kolay ve ucuz bir model olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Larva modelinin, memeli modellerine alternatif olarak yaygınlaşması etik kaygıların azalmasına da katkıda bulunacaktır.*

Anahtar kelimeler: *Candida albicans, Galleria mellonella, salgısal asit proteinaz*

SUMMARY

Using Galleria mellonella Larvae as the in Vivo Model in Investigating the Secretory Acid Proteinase Activity of Candida albicans

Aim: *Mouse-rat models have been used for many years in studying the pathogenesis of infectious diseases. Using Galleria mellonella larvae was accepted in the literature as a model host for many microorganisms that are important for medical reseach. In this study, the secretory acid proteinase (SAP) enzyme activity of Candida albicans was investigated on the G. mellonella larvae as a model host.*

Material and Method: *Two clinical C. albicans strains were used for the infection model, which had positive and negative SAP enzyme activity determined by bovine serum albumin agar method. Healthy G. mellonella larvae of 2-3 cm length and 250-300 mg weight in the last larval stage, were divided into four groups; control, sham (phosphate buffer), SAP positive and SAP negative (10^5 CFU/ml) C. albicans-infected group. Larvae were left at 37ºC. Their health conditions were scored after 96 hours and they were sacrificed. Fungal burden was studied.*

Results: *A significant difference was found between the groups when evaluated in terms of activity, survival, melanization and fungal load of larvae. The control and sham groups showed no death and melanization, no pathogen growth was detected at the end of 96 hours. Fungal burden, melanization and total health score showed significant difference between the SAP positive and SAP negative groups ($p<0.05$).*

Conclusion: *In our study, the role of the SAP enzyme activity of C. albicans on the virulence was demonstrated in G. mellonella larvae in vivo model. G. mellonella larvae model can be used as a reliable, easily applicable and an inexpensive method in investigating the effects of fungal infections and virulence factors such as SAP on host cells. Widespread use of the larvae model as an alternative to mammalian models will also contribute to reducing ethical concerns.*

Key words: *Candida albicans, Galleria mellonella, secretory acid proteinase*

Alındığı tarih: 17.06.2016
Kabul tarihi: 23.07.2016
Yazışma adresi: Meral Karaman, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balçova / İzmir
Tel: (0232) 412 45 17
e-posta: meral.karaman@deu.edu.tr
§ Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi IX. Özel Çalışma Modülü Sempozyumunda (30 Eylül 2015, İzmir) sunulmuştur.

GİRİŞ

Sağlıklı insan mikrobiyomunun bir üyesi olan *Candida albicans* aynı zamanda klinik örneklerden en sık soyutlanan maya türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut veya kronik lokalize mukokutanöz enfeksiyonlardan yaşamı tehdit eden sistemik hastalıklara kadar geniş bir yelpazede klinik tabloya neden olabilmektedir[1,2]. Kolonizasyon ve ardından enfeksiyona giden süreçte, konakçıya ait faktörlerin yanı sıra *C. albicans*'ın sahip olduğu türe özgü virülans faktörlerinin de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bilindiği gibi; hormonal değişiklikler, uzun süreli ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, invazif cerrahi girişimler, immün yetmezliğe yol açan kanser, AIDS gibi hastalıklar ve immün sistemi baskılayan ajanlar kandida enfeksiyonlarına yatkınlığı artırmaktadır[2,3]. *C. albicans* için önemli virülans faktörleri arasında germ tüp oluşumu, biyofilm aktivitesi, salgısal asit proteinaz (SAP), fosfolipaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimlerin varlığı sayılabilir[4,5].

SAP, karboksil ya da asit proteinaz olarak da adlandırılan aspartik proteazlardır. SAP enzimi lezyon bölgelerinde bulunan albümin, hemoglobin, keratin, kollajen, müsin ve salgısal IgA (sIgA) gibi birçok proteini parçalayabilme özelliğine sahiptir. sIgA'ların mikroorganizmalara karşı mukozal savunmada önemli mekanizmalardan biri olduğu düşünüldüğünde bu maddelerin kandidal proteinazlarca kolayca parçalanmasının fungal adheransa yol açabileceği ileri sürülmüştür[6].

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin ve etkili tedavi protokollerinin araştırılmasında, hayvan modelleri uzun yıllardır önemli katkılarda bulunmaktadır. Kemirgenler, özellikle de fare ve sıçanlar insandaki enfeksiyon sürecini taklit etmek için uygun bir anatomik ve biyolojik model olması, enfeksiyon ajanlarına duyarlılık ve immün yanıt açısından benzerlik göstermesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir[7]. Ancak son yıllarda laboratuvar alt yapı ve donanımlarının yetersizliği, maliyet açısından etkin olması, ahlaki açıdan daha ciddi sorgulanması bu çalışmalarda kısıtlamayı getirmiştir. Alternatif bir yaklaşım olarak aslında uzun yıllardır kullanılmakta olan *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* gibi omurgasız modelleri gündeme gelmekle birlikte, bu modeller arasında büyük balmumu güvesi (The Greater Wax Moth) olarak da bilinen *Galleria mellonella* larvaları ön plana çıkmıştır.

Bu noktada *G. mellonella* larvaların diğer omurgasızlara göre sahip olduğu bazı üstünlükler dikkati çekmektedir. Diğer böceklerde olduğu gibi hızlı bir üreme döngüsüne sahip olmanın yanı sıra yetiştirmenin kolay ve ucuz olması, büyük boyutları (~2-4 cm) nedeniyle enfeksiyon etkenlerinin ya da antimikrobiyallerin yineleyen enjeksiyonlarına uygun olması, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin memeliler ile yapısal ve fonksiyonel açıdan benzerlik göstermesi sayılabilir[8-10]. Enfeksiyon patogenezi açısından en önemli üstünlüğü ise 15-37°C'da yaşayabilme yeteneğidir. Tıbbi öneme sahip birçok patojen için virülans faktörlerinin ekspresyonu 37°C'da gerçekleştiğinden patogenez çalışmalarında bu oldukça önemli bir parametredir[11].

Bu çalışmada *C. albicans*'ın SAP enzim aktivitesinin, konakçı modeli olarak *G. mellonella* larva üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

C. albicans, SAP etkinliği ve inokulumun hazırlanması

Çalışmamızda, solunum yolu örneklerinden hastalık etkeni olarak soyutlanan ve çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar besiyerindeki görünümü, karbonhidrat fermentasyonu ve Vitek otomatize sistem kullanılarak *C. albicans*

olarak tanımlanan, SAP aktivitesi olumlu ve olumsuz saptanan iki suş kullanıldı. Suşların SAP enzim aktivitesi sığır serum albümin agar (SSAA) yöntemi ile belirlendi[12]. Enfeksiyon modeli için suşlar 9 mm çaplı plaklara dökülmüş SDA (Sabouraud's Dextrose Agar, Conda, Fransa)'ya ekim yapılarak 24 saat süreyle 35ºC'de inkübe edildi. Ertesi gün oluşan koloniler steril öze ile toplanarak YPD sıvı besiyerinde (Yeast Peptone Dextrose broth; 1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose, Conda, Fransa) 30ºC'de bir gece bekletildi. Süspansion PBS (Phosphate Buffered Saline) ile üç kez yıkandıktan sonra $5x10^5$ CFU/ml yoğunlukta hazırlandı[13].

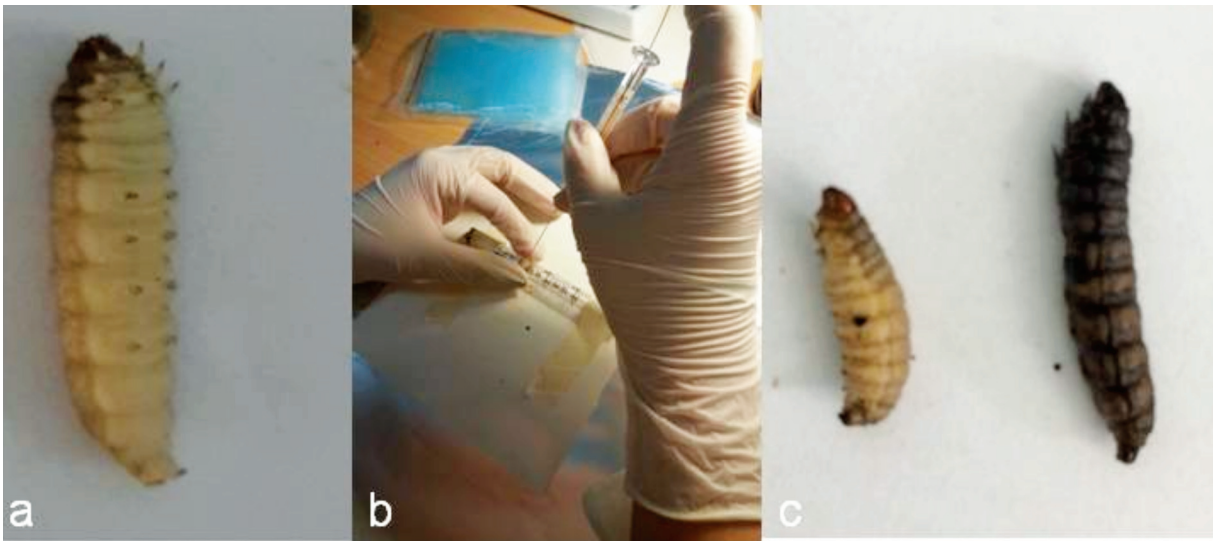
Tablo 1. Larvaların sağlık durumlarını değerlendirme kriterleri[14].

Kriter	Tanımlama	Puan
Aktivite	Aktivite yok	0
	Uyarı ile az aktif	1
	Uyarı ile belirgin aktif	2
	Aktif	3
Koza formasyonu	Koza yok	0
	Kısmi koza	0.5
	Tamamen koza	1
Melanizasyon	Tamamen melanize	0
	Kahverengi larvada siyah noktalar	0
	Bej larvada ≥3 siyah nokta	2
	Bej larvada <3 siyah nokta	3
	Melanizasyon yok	4
Yaşamda kalma	Ölü	0
	Yaşıyor	2

G. mellonella larvalar ve enfeksiyon modeli

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden alınarak Anabilim dalımız laboratuvarlarında üretilen *G. mellonella* larvalar kullanıldı. Son larval evrede yaklaşık ~2-3 cm uzunluğunda 250-300 mg ağırlığında, sağlıklı (görsel olarak açık renkli) (Resim 1a) 40 adet *G. mellonella* larva steril petri kutularına alındı. Larvalar; Grup 1 (n=10); sağlıklı kontrol grubu, grup 2 (n=10); "sham" grubu, grup 3 (n=10); SAP olumlu *C. albicans* ile enfekte grup ve grup 4 (n=10); SAP olumsuz *C. albicans* ile enfekte grup olmak üzere dört gruba ayrıldı.

Candida albicans inokulasyonu için larvalar %70 alkol ile ve steril eküvyon aracılığı ile silindi. $5x10^5$ CFU/ml yoğunluktaki maya suspansiyonundan 5 µL larvaların sol en son bacaklarına (proleg) Hamilton enjektörü (26's gauge, Fisher) ile doğrudan enjekte edildi (Resim 1b). "Sham" grubuna aynı miktarda steril PBS verilirken, kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı.



Resim (1a) Sağlıklı larva; (1b) *G. mellonella*; enjeksiyon yöntemiyle enfeksiyon modeli; (1c) Enfekte larvada melanizasyon odakları ve 96.saat sonunda melanize larva.

Larvalar içinde besin bulunan ve ağızları kapatılan petri kutuları içinde, 37ºC'de bekletildi.

Sağlık puanlaması

Larvalar 24 saat aralıklar ile gözlemlendi ve 96 saat sonra sağlık durumları literatür önerileri doğrultusunda; aktivite, koza formasyonu, melanizasyon ve hayatta kalma açısından skorlandı[14] (Tablo 1).

Fungal yükün saptanması

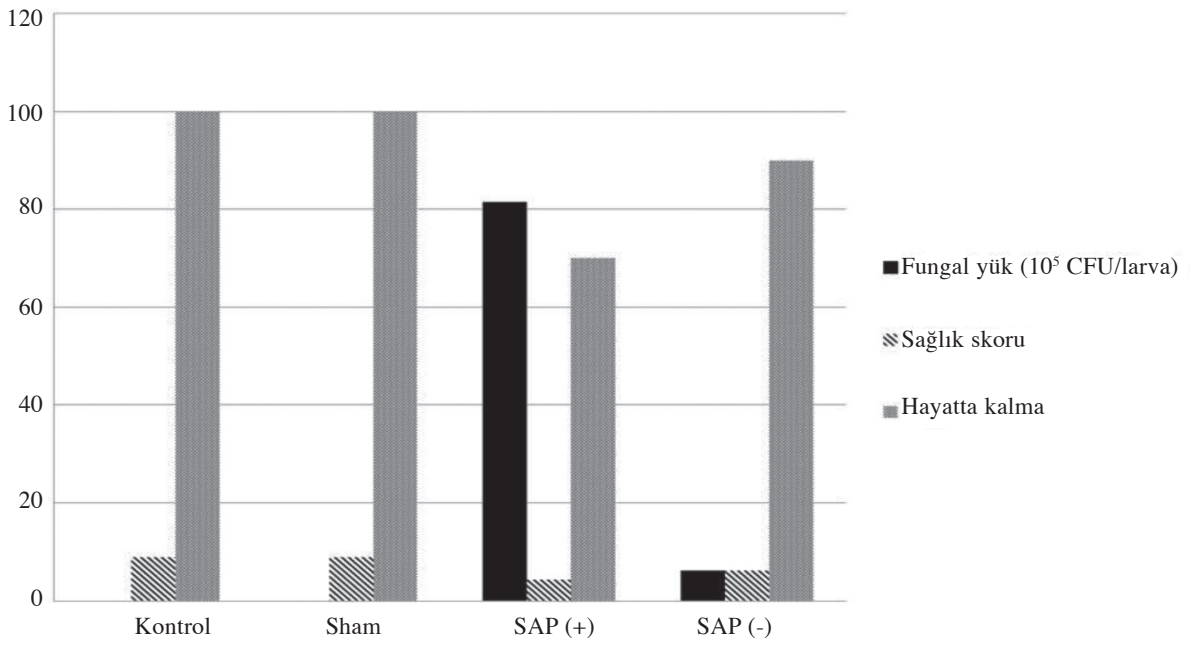
Doksan altı saat sonunda soğuk şok ile öldürülen larvalar %70 alkol ile temizlendi. Larvalar 1 ml PBS ve 5 mm çapında steril paslanmaz çelik boncuk içeren ependorflara alındı. Ependorflar TissueLyser LT raklarına alınıp TissueLyser (Qiagen-Almanya) doku homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Frekans 50, zaman 5 dakikaya ayarlandı. Homojenizasyon işleminin ardından SDA'ya kantitatif ekim yapılarak plaklar 37ºC'de 48 saat inkübe edildi. Fungal yük larva başına düşen koloni oluşturan ünite (Colony Forming Unit; CFU/Larva) olarak hesaplandı.

İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel işlemler SPSS 15.0 istatistik programında yapıldı. İkili grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U test testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p<0.05$ alındı.

BULGULAR

Larvalar ilk 24 saat sonunda değerlendirildiğinde grup 3 (SAP olumlu) hariç tüm gruplarda koza formasyonu, melanizasyon ya da ölüm gözlenmezken, grup 3 larvalarda diğerlerinden farklı olarak yaklaşık 0.5 mm çapında siyah noktalar (melanizasyon odakları) belirlendi. Bu odakların aynı grupta 48. saatte belirginleştiği ve sayıca arttığı, 96. saat sonunda ise tüm larvaların tamamen melanize olduğu gözlendi (Resim 1c). İnokulasyon sonrası 96. saat sonunda kontrol ve "sham" gruplarında ölüm ve melanizasyon gözlenmezken, SAP olumsuz grupta (grup 4) melanizasyon sınırlıydı. SAP olumlu ve olumsuz gruplar arasında tek başına yaşamda kalma oranlarına bakıldığında fark gözlenmekle birlikte



Şekil 1. İnokulasyon sonrası 96. saat sonunda gruplara göre sağlık skoru ve fungal yük sonuçları.

Tablo 2. İnokulasyon sonrası 96. saatte fungal yük, sağlık skoru ve yaşamda kalma oranları (SAP: Salgısal Asit Proteinaz).

Gruplar (n=10)	Fungal yük (x10^5 CFU/ml)	Sağlık skoru	Hayatta kalma (%)
Kontrol	-	9.00±0.00	10/10 (100)
"Sham"	-	9.00±0.00	10/10 (100)
SAP (+)	81.57±65.74	4.28±0.75	10/3 (70)
SAP (-)	6.14±8.83	6.14±0.69	10/1 (90)

bu fark anlamlı değildi. Toplam sağlık skoru açısından ise farklılık anlamlı bulundu ($p<0.05$). (Şekil 1, Tablo 2).

Sakrifikasyon sonrası yapılan kantitatif ekimler sonucunda fungal yük açısından değerlendirildiğinde ise, kontrol ve sham gruplarında herhangi bir patojen üremesi saptanmazken, Grup 3'te üreme anlamlı olarak yoğundu ($p<0.05$; Şekil 1, Tablo 2).

TARTIŞMA

Fırsatçı bir mantar olan *C. albicans*'ın enfeksiyon oluşturabilmesi için konağın savunma sistemini aşabilecek bazı virülans faktörlerine sahip olması gerekmektedir. SAP, fosfolipaz, esteraz gibi hidrolitik enzimlerin salınımı ve slime aktivitesi bu faktörler arasında sayılabilir. Hidrolitik enzimler, antimikrobiyal aktiviteye karşı koymak ve immün sistemden kaçmak için konakçı hücrelerine saldırı yeteneğindedir. *C. albicans*, SAP enzim aktivitesi ile; keratin, albümin, hemoglobin, kazein, kollajen gibi proteinleri parçalayarak epitelyum hücrelerine girmekte ve derin dokulara yayılabilmektedir. SAP enzim ailesinin; laktoferrin, çeşitli immünoglobulinler (özellikle salgısal IgA), laktoperoksidaz, katepsin D, proenflamatuar sitokin IL-1b, α2 makroglobulin gibi çeşitli proteinleri parçalama yeteneği ve diğer virülans faktörleri ile etkileşim halinde olması *C. albicans*'ın fırsatçı bir patojen olmasında rol oynamaktadır[6,15]. Bu çalışmada, *C. albicans*'ın SAP enzim aktivitesinin etkilerinin araştırılmasında in vivo model olarak *G. mellonella* larva kullanılmıştır.

Son yıllarda bazı yayınlarda SAP aktivitesinin epitelyum hücrelerine invazyon için gerekli olmadığı[16] bildirilmekle birlikte, canlı konakçı olarak *G. mellonella* larva kullandığımız çalışmamızda hem sağlık skorlaması hem de fungal yük açısından elde edilen veriler bu enzimin varlığının önemini ortaya koymaktadır. SAP olumlu *C. albicans* ile enfekte larvalar inokulasyon sonrası immün yanıtın güçlü bir şekilde uyarılması sonucunda ilerleyici melanizasyon göstermişler ve yaşamda kalma oranları düşük bulunmuştur. Ayrıca SAP olumlu suşlarla enfekte grupta fungal yük anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Verilerimiz *C. albicans* türlerinde, proteinaz üretimi ile konak dokuya adhere olabilme yeteneği arasındaki ilişkiye vurgu yapan ve proteinaz üretmeyen kökenlerin üretenlere oranla virülanslarının düşük olduğu, zayıf patojen oldukları ya da patojen olmadıklarını bildiren yayınlarla paralellik göstermektedir[17-20].

Günümüzde fungal patogenezi, özellikle kolonizasyondan enfeksiyona uzanan süreçte konakçı fungus etkileşimini daha iyi anlayabilmek, yeni ve etkili tedavi yöntemlerini geliştirebilmek için hayvan deneyleri kaçınılmazdır. Fungal patogenezin araştırılmasında memeli modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Fareler birçok avantaja sahip olmasına rağmen, altın standart olarak kabul edilen bu model aynı zamanda dezavantajlara da sahiptir. Fare deneylerinin maliyet, zaman, laboratuvar alt yapı ve donanımı açısından aşırı yük getirmesinin yanısıra etik açıdan oldukça hassas bir konu olması başlıca noktalardır. Deneylerde memeli kullanımının kısıtlanmasına yönelik artan baskılar omurgasız hayvan modellerini ön plana çıkarmıştır. Tıbbi öneme sahip birçok mikroorganizmanın model konakçısı olarak *G. mellonella* larva kullanımı literatürde oldukça kabul görmüştür[11,21,22]. Fungal virülans ve antifungal ilaç etkinliği çalışmalarında omurgasız tür *G. mellonella* larva kullanımı

son on yılda giderek artmıştır[23-27]. Ülkemizde ise konakçı modeli olarak larva kullanımında hareketlilik dikkati çekmektedir[22,28].

Galleria mellonella larva modelinin ön plana çıkmasında hemolenf ile ilgili bilinmeyenlerin azalması ve larvanın doğuştan gelen bağışıklık sisteminin memeliler ile yapısal ve fonksiyonel açıdan benzerliklerinin belirlenmesi gösterilebilir[9,10]. Enfeksiyon patogenezi çalışmalarında ise, 15-37°C'da yaşayabilme yeteneği, diğer omurgasızlara göre büyük boyutları (2-4 cm) nedeniyle uygulamaların kolay olması ve modelleme sonrası çok miktarda (~20-50 μL) hemolenf eldesiyle fagositoz benzeri immünite ile ilişkili olayların izlenmesinin, patojenlerin izolasyonunun olası olması ön plana çıkmaktadır[11,24,25]. Bu üstünlükleri *G. mellonella* larvayı fungal patogenez ve antifungal ilaç etkinliği çalışmalarında tercih edilir bir model hâline getirmiştir.

Ancak, bu avantajların yanısıra örneğin kandida enfeksiyonlarına immün yanıtta hangi hemosit türünün baskın olduğu ya da hangi mantar ligandların hangi hemosit reseptörü ile bağlantılı olduğu gibi bazı açıklanmayan noktalar eksikliktir[29]. Bu bilinmeyenlere yanıt için, hücresel ve moleküler düzeyde farklı çalışmaların artırılmasına ve *G. mellonella* genomunun tamamının bilinmesine gereksinim duyulmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda *C. albicans*'ın SAP enzim aktivitesinin virülansta rol oynadığı canlı konakçı olarak *G. mellonella* larvada gösterilmiştir. Sonuçlarımız fungal enfeksiyonların ve SAP gibi virülans faktörlerinin konak hücreye etkilerinin araştırılmasında *G. mellonella* larva modelinin güvenilir, ucuz ve uygulaması kolay bir model olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Larva modelinin, memeli modellerine alternatif bir model olarak yaygınlaşmasının etik kaygıların azalmasına da katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

Teşekkür

Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Fevzi Uçkan ve ekibine *G. melonella* larvaları temin ettikleri, üretim ve yetiştirme konusunda bilgi ve becerilerini paylaştıkları için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD.** Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:419-25. http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0159-2
2. **Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, et al.** Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* 2009; 37:1612-8. http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819efac0
3. **Edwards JE.** *Candida* Species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol 2. New York, Churchill Livigstone 1995.
4. **Haynes K.** Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; 9:591-6. http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02237-5
5. **Calderone RA, Fonzi WA.** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9:327-35. http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7
6. **Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B.** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:400-28. http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003
7. **Beynen AC, Hau J.** Animal models. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. Principles of Laboratory Animal Science. Revised Ed. Amsterdam: Elsevier; 2001; 197-205.
8. **Ellis JD, Graham JR, Mortensen A.** Standard methods for wax moth research. *J Apic Res* 2013; 52:1-17. http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.10
9. **Lionakis MS.** Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2011; 2:521-7. http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.6.18520
10. **Hoffmann JA.** Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:4-10. http://dx.doi.org/10.1016/0952-7915(95)80022-0
11. **Junqueira JC.** Galleria mellonella as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence* 2012; 3:474-6. http://dx.doi.org/10.4161/viru.22493
12. **Ray TL, Payne CD.** Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990;

58:508-14.

13. **Li DD, Deng L, Hu GH, et al.** Using *Galleria mellonella-Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull* 2013; 36:1482-7. http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00270
14. **Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T.** *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 2013; 4:419-28. http://dx.doi.org/10.4161/viru.24930
15. **Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B.** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48:365-7. http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x
16. **Lermann U, Morschhäuser J.** Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology* 2008; 154:3281-95. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/022525-0
17. **Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT.** Genetic evidence of role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1985; 49:571-6.
18. **Kuştimur S.** Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. *Mikrobiyol Bul* 1994; 28:175-81.
19. **Pichová I, Pavlicková L, Dostál J, et al.** Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae*; Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 2001; 268:2669-77. http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02152.x
20. **De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, et al.** Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 1996; 64:466-71.
21. **Mukherjee K, Domann E, Hain T.** The Greater Wax Moth *Galleria mellonella* as an Alternative Model Host for Human Pathogens. In: Vilcinskas A, eds. Insect Biotechnology. London: Springer; 2011; 3-12. http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9641-8_1
22. **Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, et al.** Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:366-76. http://dx.doi.org/10.5578/mb.9701
23. **Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E.** Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 2010; 1:475-82. http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.6.12985
24. **Fallon J, Kelly J, Kavanagh K.** *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. *Methods Mol Biol* 2012; 845:469-85. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_33
25. **Cotter G, Doyle S, Kavanagh K.** Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27:163-9. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01427.x
26. **Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K.** Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34:153-7. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00617.x
27. **Favre-Godal Q, Dorsaz S, Queiroz EF, et al.** Comprehensive approach for the detection of antifungal com- pounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochemistry* 2014; 105:68-78. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.004
28. **Karaman M, Alvandian A, Bahar İH.** *Galleria mellonella* larva modelinde *Candida albicans* biyofilm formasyonunun etkilerinin değerlendirilmesi. KLİMİK 2015, XVII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 25-29 Mart 2015, Antalya. Kongre kitabı, 2015; (P10-02) 268.
29. **Lionakis MS, Fischer BG, Lim JK, et al.** Chemokine receptor Ccr1 drives neutrophil-mediated kidney immunopathology and mortality in invasive candidiasis. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002865. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002865

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(2):76-81, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.076

Araştırma

Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarında 2011-2015 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı[§]

Serkan BAŞTEMİR*, Koray ÖNCEL, Kor YERELİ**, Ali Ahmet KİLİMCİOĞLU**, Cüneyt BALCIOĞLU**, Nogay GİRGİNKARDEŞLER****

**Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı*

***Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı*

ÖZET

Amaç: *Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tıbbi Parazitoloji laboratuvarına Ocak 2011 ve Aralık 2015 tarihleri arasındaki beş yıl içinde selofan bant ve dışkıda parazit bakısı için başvuran toplam 19042 hastanın sonuçları değerlendirilmiştir.*

Gereç ve Yöntem: *Tüm dışkılara doğrudan bakı (nativ-Lugol), formol etil asetat çöktürme ve trikrom boyama yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca selofan bant örneği alınan 7757 hastanın preparatları incelenmiştir.*

Bulgular: *Beş yılda başvuran 19042 hastanın 1865'inde (%9.79) bağırsak paraziti saptanmıştır. En yüksek parazit oranına 2013 yılında (%13.19) rastlanmıştır. En sık Blastocystis spp. 1.263 (%6.63), Giardia intestinalis 277 (%1.45) ve Dientamoeba fragilis 160 (%0.84) dışkı örneğinde görülmüştür. Selofan bant örneği alınan 7757 hastanın 139'unda (%1.79) Enterobius vermicularis görülmüştür. Pozitif olguların 127'sinde (%6.33) iki veya daha fazla parazit birlikte görülmüştür. Kadınlarda parazit görülme oranı %11.2 iken, erkeklerde %10.81 olarak saptanmıştır.*

Sonuç: *Bağırsak parazit bakısı için beş yıllık süreçte başvuran hastalarda en sık Blastocystis spp., G. intestinalis ve D. fragilis görülmüştür. Bulgularımız bağırsak parazitlerinin önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermiştir.*

Anahtar kelimeler: *Bağırsak parazitleri, Manisa, Trikrom boyama*

SUMMARY

Frequency of Intestinal Parasites Detected in the Laboratory of Medical Parasitology in Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital Between 2011 and 2015

Objective: *Results of 19.042 patients admitted to the Laboratory of Medical Parasitology in Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital for parasitological stool examination between January 2011 and December 2015 were evaluated.*

Material and Methods: *All stool samples were examined with wet mount (native-Lugol), formaline ethyl acetate concentration and trichrome staining methods. Besides; cellophane tape preparations of 7757 patients were examined.*

Results: *Intestinal parasites were detected in 1865 (9.79%) of 19.042 patients who were admitted during a five year period. The highest rate of parasites (13.19%) was detected in 2013. The most frequently identified intestinal parasites were Blastocystis spp. 1.263 (6.63%), Giardia intestinalis 277 (1.45%) and Dientamoeba fragilis 160 (0.84%) in stool samples. Cellophane tape samples were collected from 7757 patients and Enterobius vermicularis was detected in 139. Two or more parasites were detected in 127 (6.33%) of the positive cases. The frequency of parasites was 11.2% in females and 10.81% in males.*

Conclusion: *Blastocystis spp., G. intestinalis and D. fragilis were the most frequently detected intestinal parasites in patients admitted during a five year period. Our findings showed that intestinal parasites are an important public health problem.*

Key words: *Intestinal parasites, Manisa, Trichrome staining*

Alındığı tarih: 02.03.2016
Kabul tarihi: 17.06.2016
Yazışma adresi: Serkan Baştemir, Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa
e-posta: drserkanbastemir@gmail.com
[§] Bu çalışmanın bir bölümü 5-9 Ekim 2015 tarihinde Erzurum'da düzenlenen 19. Ulusal Parazitoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Dünyada 3.5 milyar insanın bağırsak parazitleri ile enfekte olduğu, bunların büyük kısmını çocukların oluşturduğu bildirilmektedir. Bağırsak parazit enfeksiyonları özellikle ishal, karın ağrısı, gaz ve diğer gastrointestinal sistem yakınmalarına yol açan önemli bir toplum sağlığı sorunudur[1]. Bağırsak parazitlerinin görülme sıklığını sosyoekonomik düzey ve eğitim düzeyinin düşüklüğü, mevsimsel ve çevresel değişiklikler, beslenme alışkanlıkları gibi faktörler arttırmaktadır. Büyüme çağındaki çocuklar başta olmak üzere toplumun bütün kesimleri bağırsak parazitlerinin neden olduğu enfeksiyonlardan olumsuz etkilenmektedir.

Bu çalışmada, Ocak 2011-Aralık 2015 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda saptanan bağırsak parazitleri ve pozitif olguların cinsiyet, yaş ve yıllara göre dağılımları araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Retrospektif özellikteki bu çalışmada farklı polikliniklerden çeşitli gastrointestinal yakınmalarla gönderilen 19042 hastaya ait dışkı örneği ve 7757 hastadan alınan selofan bant örneği parazitolojik olarak değerlendirilmiştir.

İlk aşamada dışkı örnekleri makroskobik olarak incelenmiştir. Daha sonrasında; dışkı örnekleri doğrudan bakı (nativ-Lugol) ve %10 formol etil asetat yoğunlaştırma ve trikrom kalıcı boyama yöntemleriyle incelenmiştir. Hazırlanan doğrudan bakı preparatları ile %10 formol etil asetat yoğunlaştırma yöntemi için hazırlanan preparatlar x40 büyütmeli objektifle ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. İncelenen dışkı örneğinde *Blastocystis* spp. ve apatojenler haricindeki tüm parazitler mikroskop sahasında bir tane bile görüldüğünde, örnek pozitif olarak kabul edilmiştir. Buna karşın *Blastocystis* spp. için önemli bir patojenite kriteri olan x40 büyütmede her mikroskop sahasında beş ve üstünde bu parazitin görülmesi halinde örnek pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Trikrom kalıcı boyama yöntemi yapılan preparatlar x100 büyütmeli objektif ile ışık mikroskobunda incelenmiştir. Enterobius vermicularis tanısı için olgulara selofan bant yöntemi uygulanmış, bu preparatlar X10 büyütmeli objektifle ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilerin istatistiksel önem farklılarının saptanması amacıyla Epi Info (Ver 3.5.4, CDC) programı yardımıyla ki-kare (χ^2) testiyle istatistiksel analizler yapılmıştır.

Tablo 1. Yıllara göre başvuran hasta sayıları, dışkı incelemesinde pozitif saptanan olguların oranları ve bağırsak parazitlerinin dağılımı.

	2011 (n=3363)		2012 (n=3581)		2013 (n=2700)		2014 (n=5013)		2015 (n=4385)		TOPLAM (n=19042)	
Parazit	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
Blastocystis spp.	220	6.54	280	71.42	256	9.48	294	5.86	213	4.85	1263	6.63
Giardia intestinalis	37	1.10	60	15.30	46	1.70	67	1.33	67	1.52	277	1.45
Dientamoeba fragilis	11	0.32	25	6.37	21	0.77	52	1.03	51	1.16	160	0.84
Entamoeba coli	20	0.59	15	3.82	18	0.66	24	0.47	35	0.79	112	0.58
Iodomoeba bütschlii	4	0.11	5	1.27	8	0.29	1	0.01	5	0.11	23	0.12
Entamoeba histolytica/dispar	2	0.05	2	0.51	4	0.14	4	0.07	4	0.09	16	0.08
Taenia saginata	2	0.05	3	0.76	1	0.03	3	0.05	-	-	9	0.04
Hymenolepis nana	-	-	2	0.51	2	0.07	1	0.01	-	-	5	0.02
Toplam	296	8.80	392	10.94	356	13.19	446	8.89	375	8.55	1865	9.79

Tablo 2. Parazit birlikteliği görülen olguların yıllara göre dağılımı.

Parazit	2011	2012	2013	2014	2015	Toplam
Blastocystis spp. + G. intestinalis	2	7	5	13	11	38
Blastocystis spp. + E. coli	5	6	3	8	9	31
Blastocystis spp. + I. bütschlii	1	-	1	1	-	3
Blastocystis spp. + D. fragilis	2	2	7	6	2	19
Blastocystis spp. + E. coli + D. fragilis	1	-	-	-	-	1
Blastocystis spp. + E. vermicularis	3	1	4	-	1	9
D. fragilis + E. coli + I. bütschlii	1	-	-	-	-	1
G. intestinalis + I. bütschlii	2	-	-	-	-	2
Blastocystis spp. + G. intestinalis + E. vermicularis	-	-	1	-	-	1
G. intestinalis + E. vermicularis	-	2	1	1	-	4
Blastocystis spp. + E. histolytica/dispar	-	-	2	-	-	2
Blastocystis spp. + E. coli+ G. intestinalis	-	-	1	-	-	1
D. fragilis + E. vermicularis	-	2	1	1	-	4
E. coli + H. nana	-	-	1	-	-	1
Blastocystis spp. + E. coli + G. intestinalis+ I. bütschlii	-	-	1	-	-	1
G. intestinalis + E. histolytica/dispar	-	-	-	1	-	1
Blastocystis spp. + G. intestinalis + D. fragilis	-	-	-	1	-	1
D. fragilis + E. coli	-	1	1	1	-	3
D. fragilis + G. intestinalis	-	-	2	1	1	4

Tablo 3. Yıllara göre başvuran hasta sayılarının cinsiyete göre dağılımı ve pozitif olguların oranları.

	Parazit			
	Negatif		Pozitif	
Cinsiyet	Sayı	%	Sayı	%
Erkek (n=10192)	9090	89.19	1102	10.81
Kadın (n=8850)	7948	89.80	902	11.20

Tablo 4. Yıllara göre selofan bant örneği alınan hastaların sayısı ve *Enterobius vermicularis* dağılımı.

Yıllar	n	Sayı	%
2011	1565	19	1.21
2012	1756	25	1.42
2013	1348	24	1.78
2014	1662	35	2.10
2015	1426	36	2.52
Toplam	7757	139	1.79

BULGULAR

Beş yıl boyunca başvuran ve dışkı incelemesi yaptığımız 19042 hastanın 1865'inde (%9.79) bağırsak paraziti saptanmıştır. Yıllara göre hasta sayıları, pozitif olguların oranları ve saptanan bağırsak parazit türlerinin yıllara göre detaylı dağılımları Tablo 1'de verilmiştir. Pozitif saptadığımız hastaların 127'sinde (%6.33) birden fazla parazit bir arada görülmüş olup, parazit birliktelikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Başvuran tüm hastaların cinsiyete göre parazit görülme sıklığı değerlendirildiğinde, erkek hastaların (n=10192) %10.81'inde (1102), kadın hastaların (n=8850) ise %11.2'sinde (902) parazit olduğu tespit edilmiştir. Yıllara göre başvuran hasta sayılarının cinsiyete göre dağılımı ve pozitif olguların oranları Tablo 3'te verilmiştir. Cinsiyete göre dağılımda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (χ^2=0.2; p>0.05).

Selofan bant örneği aldığımız hastalarda *E. vermicularis* görülme oranları Tablo 4'te verilmiştir. *E. vermicularis* sıklığı yıllara göre değerlendirildiğinde bu parazitin istatistiksel olarak artan oranlarda saptandığı gözlenmiştir (χ^2=7.09; p=0.003)

İki parazitin bir arada bulunduğu hastalarda en çok *Blastocystis* spp. ve *Giardia intestinalis* (38 olgu) birlikteliği saptanmış, parazit birlikteliği görülen 127 olgunun altısında ikiden fazla parazit birlikte görülmüştür.

Tüm dışkı örneklerinde en sık *Blastocystis* spp. (n=1263; %6.63), *G. intestinalis* (n=277; %1.45) ve *D. fragilis* (n=160; %0.84) görülmüştür.

Parazit olduğu tespit edilen hastalar yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde %65.32'sinin (n=1309) 0-18 yaş, %25.84'ünün (n=518) 19-45 yaş ve %8.84'ünün ise (n=177) 46 yaş ve üzerinde olduğu saptanmıştır. Yaş grupları açısından ise çocuk yaş grubu diyebileceğimiz 0-18 yaş grubundaki fazlalığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (χ^2=26; p<0.0001).

TARTIŞMA

Ülkelerin gelişmişlik düzeylerinden bağımsız olarak bağırsak parazitleri çocukluk çağında daha fazla olmak üzere tüm sosyoekonomik düzeylerde her yaş grubunda görülebilmektedir[2]. Düşük sosyokültürel düzey, çocukların hijyen kurallarına dikkat etmemesi veya bu konuda çocuklara yeterli eğitim verilmemesi, iklim şartları gibi faktörler bu enfeksiyonların sık görülmesinin önemli nedenlerindendir[3,4].

Çalışmamızda, 2011-2015 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastaların %9.79'unda bağırsak paraziti (apatojen parazitler dâhil) tespit edilmiştir. Buna ek olarak selofan bant örneği alabildiğimiz toplam 7757 kişiden 139 kişide (%1.79 oranında) *E. vermicularis* pozitifliği de bulunmaktadır. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalara baktığımızda bağırsak parazitlerinin görülme oranının %3.6 ile %43.1 arasında olduğu görülmüştür[5-7]. Bağırsak parazitleriyle ilgili yurt dışında yapılmış olan bazı çalışmalarda ise bu oranın %10.7 ile % 18.02 arasında olduğu bildirilmiştir[8-10]. Çalışmalardaki bu farklı oranlar seçilen popülasyonun yeri ve özelliğine, kullanılan tanı yöntemlerine, araştırmacıların parazitlerin tanısındaki deneyimine göre değişmekle birlikte, bize çalışmaların yapıldığı yerlerin temizlik alışkanlıklarına, sosyokültürel düzeyine, alt yapının durumuna ve bölgedeki iklim şartlarına bağlı olarak parazitlerin görülme oranlarının değişebileceğini de düşündürmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda beş yıl içinde en fazla parazit görülme oranlarının 2012 ile (%10.95) 2013 yılında (%13.19) olduğu görülmüştür. Manisa yöresinde beş yılı kapsayan daha önce yapılan bir başka çalışmada ise parazit görülme oranlarının %8.73 ile %14.89 arasında değiştiği ve beş yıllık ortalamanın %11.77 olduğu bildirilmiştir[11]. Çalışmamızda, beş yıllık oranların %9.36 ile %14.07 arasında değiştiği ve ortalamanın %10.52 olduğu görülmüştür. Önceki çalışma ile karşılaştırdığımızda son 10 yılda Manisa'da parazit görülme oranlarının azalma eğiliminde olduğu görülmekle birlikte, alt yapı çalışmalarındaki ilerlemelere rağmen, 2012 ve 2013 yıllarında parazit görülme oranlarında ortalamanın üzerindeki artış dikkat çekicidir.

Ülkemizde yapılan benzer bazı çalışmalarda *E. vermicularis* görülme oranı İzmir'de[1] %0.16, Kayseri'de[3] %2.45, Yozgat'ta[6] %8.4 ve Malatya'da[12] %8.3 bulunmuştur. Çalışmamızda ise, *E. vermicularis* oranının %1.79 olduğu görülmüştür. Birbirlerine komşu olan İzmir ve Manisa illerinde *E. vermicularis* görülme oranlarındaki farklılık düşündürücü olmakla birlikte, Manisa'da saptadığımız oranın ülkemizin diğer illerindeki görülme yüzdesinden düşük olması kişisel bakım koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. *E. vermicularis*'in insandan insana bulaşmasının kolay ve hızlı olması, kişisel temizlik ve sağlık alışkanlıklarının yetersiz olması nedeniyle enterobiasis özellikle okul, yurt ve kreş gibi toplu yaşam alanlarında yaygın olarak görülüp halk sağlığı açısından sorun oluşturmaktadır.

Başvuran tüm olgular cinsiyete göre değerlendirildiğinde, kadınların %11.2'sinde, erkeklerin ise %10.81'inde parazit olduğu saptanmıştır.

Kadın ve erkeklerde görülen parazit oranının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Bu oran ülkemizde farklı yerlerde yapılan ve cinsiyetler arasında anlamlı bir fark olmadığını belirten bazı çalışmalarla uyumlu bulunmuştur[12,13-16].

Parazit olduğu saptanan hastalar yaş gruplarına göre ayrıldığında en fazla parazit görülme oranının (%65.32) 0-18 yaş grubunda görüldüğü tespit edilmiş, benzer şekilde yapılan birçok çalışmada da parazitlere en sık çocukluk çağında rastlandığı bildirilmiştir[11,15,17,18]. Bu durumun çocukların kişisel temizliğe yeterince dikkat etmemesi, çoğunlukla kreş veya okul gibi toplu yaşam alanlarında vakit geçirmeleri ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bulgularımızdan farklı olarak Dağcı ve ark.[19] parazit görülme yüzdesinin en sık 15-45 yaş aralığında olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada, en sık (%6.63) görülen bağırsak paraziti *Blastocystis* spp. olmuştur. Çalışmamıza benzer bir şekilde, yapılan birçok çalışmada da en sık saptanan bağırsak parazitinin *Blastocystis* spp. olduğu bildirilmiştir[11,13,20]. Çalışmamızda, ikinci sıklıkta (%1.45) *G. intestinalis* saptanmıştır. Usluca ve ark.[1] yaptığı bir çalışmada, benzer sonuçlar görülmüşken, diğer bazı çalışmalarda ise *G. intestinalis*'in en sık görülen parazit olduğu bildirilmiştir[11,21,22]. Çalışmamızda, üçüncü sıklıkta *D. fragilis* (%0.84) görülmüş olup ülkemizde farklı yerlerde yapılan retrospektif taramalarda bu oranın %0.46 ile %8.8 arasında olduğu saptanmıştır[11,23,24]. Girginkardeşler ve ark.[24] bu parazitin tanısında her dışkıya trikrom veya demir hematoksilen gibi kalıcı boyama yöntemlerinden birinin kesinlikle uygulanması gerektiğini vurgulamıştır. *D. fragilis* insidansının ülkemizde düşük saptanması veya bu parazitin görülmemesinin nedenleri arasında; her dışkıya kalıcı boyama yöntemlerinin uygulanmaması, preparatları inceleyen laboratuvar çalışanlarının bu parazitle ilgili yeterli deneyiminin veya eğitiminin olmamasının sayılabileceği kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda parazitle enfekte 2004 olgunun %93.67'sinde tek paraziter etken saptanırken, %6.33'ünde birden fazla parazit görülmüştür. Çalışmamızdaki bu sonuçla uyumlu olarak yerli ve yabancı birçok araştırmada parazitlerle enfekte olguların büyük kısmının tek, daha azının birden fazla parazitle enfekte olduğu bildirilmiştir[13,15,25]. İki veya daha fazla parazit görülme oranının ihmal edilemeyecek kadar yüksek olması, dışkının mikroskobik incelemesi yapılırken çok dikkatli davranılması gerektiğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, Manisa ilinde beş yıllık süreçte saptadığımız bağırsak parazit oranının %9.79, en sık görülen ilk üç parazitin ise *Blastocystis* spp., *G. intestinalis* ve *D. fragilis* olduğu belirlenmiştir. Parazit tespit edilen olguların en sık 0-18 yaş arasında olduğu ve cinsiyetlere göre parazit oranının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Bu veriler, alt yapı çalışmalarındaki ilerlemelere rağmen, ilimizde bağırsak parazitlerinin halen önemini koruduğu ve önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermiştir. Ayrıca, dışkıda parazit incelemesi yapılırken doğrudan bakı, yoğunlaştırma ve kalıcı boyama yöntemlerinin her üçünün de birlikte kullanılmasının parazitlerin tanısında daha etkili ve doğru sonuçlar verdiği kanısına varılmıştır.

Teşekkür

Bu araştırmanın hazırlanma aşamasında yorumlarıyla ve önerileriyle yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet Özbilgin'e teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. **Usluca S, İnceboz T, Över L ve ark.** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2005-2008 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34:27-31.
2. **Uzun A, Tekay F, Karaşahin Ö, Yeşilmen S, Topçu M, Gül K.** Diyarbakır il merkezinde farklı bölgelerdeki

beş ilköğretim okulunda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2004; 28:133-5.

3. **Yazar S, Yaman O, Gözkenç N, Şahin İ.** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2005; 29:261-3.
4. **Özyurt M, Kurt Ö, Yaman O, Ardıç N, Haznedaroğlu T.** Bir eğitim hastanesi Koproloji Laboratuvarı'nda geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitol Derg* 2007; 31:306-8.
5. **Doğan N, Demirüstü C, Aybey A.** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'nin beş yıllık bağırsak paraziti prevalansının türlere ve cinsiyetlere göre dağılımı, *Türkiye Parazitol Derg* 2008; 32:120-5.
6. **Ataş AD, Alim A, Ataş M, Oğuzkaya Artan M.** Yozgat il merkezinde farklı sosyo-ekonomik bölgelerdeki iki ilköğretim okulunda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2008; 32:261-5.
7. **Akısü Ç, Özkoç S, Aksoy Ü, Sarı B.** İzmir, Narlıdere'de bir ilköğretim okulunda bağırsak parazitlerinin prevalansı. *Infeks Derg* 2003; 17:487-90.
8. **Arani AS, Alaghehbandan R, Akhlaghi L, Shahi M, Lari AR.** Prevalence of intestinal parasites in a population in south of Tehran, Iran. *Rev Inst Med Trop San Paulo* 2008; 50:145-9. http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652008000300003
9. **Abah AE, Arene FO.** Status of intestinal parasitic infections among primary school children in Rivers State, Nigeria. *J Parasitol Res* 2015; 2015:937036.
10. **Papazahariadou MG, Papadopoulos EG, Frydas SE, et al.** Prevalence of gastrointestinal parasites in the Greek population: local people and refugees. *Ann Gastroenterol* 2004; 17:194-8.
11. **Düzyol D, Kilimcioğlu AA, Özyurt Cengiz B, Özkan H, Girginkardeşler N.** Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniği'nde 2006 ve 2010 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin insidansı. *Türkiye Parazitol Derg* 2012; 36:147-51.
12. **Köroğlu M, Yakupoğulları Y, Turhan R.** Malatya Devlet Hastanesi yedi yıllık kopro-parazitolojik inceleme sonuçlarının retrospektif analizi. *Türkiye Parazitol Derg* 2007; 31:201-4.
13. **Kuk S, Erensoy A.** Son bir yıl içinde Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi Parazitoloji Laboratuarı'nda kopro-parazitolojik inceleme sonuçları. *Fırat Tıp Derg* 2006; 11:113-5.A
14. **İnceboz T, Aksoy Ü, Akısü Ç ve ark.** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuranlarda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2002; 26:423-5.
15. **Alver O, Töre O.** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki bağırsak parazit olgularının prevalansı ve dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2006; 30:296-301.
16. **Demirli H, Arabacı F.** Van ilinde 6-12 yaş grubu çocuklarda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2004; 28:106-9.
17. **Gündüz T, Demirel MM, İnceboz T, Tosun S, Yereli K.** Prevalence of intestinal parasitosis in children with gastrointestinal symptoms associated with socio-economic conditions in Manisa region. *Türkiye Parazitol Derg* 2005; 29:264-7.
18. **Ostan İ, Kilimcioglu AA, Girginkardeşler N, Özyurt BC, Ok UZ.** Health inequities: lower socio-economic conditions and higher incidences of intestinal parasites. *BMC Public Health* 2007; 7:342. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-7-342
19. **Dagci H, Kurt Ö, Demirel M, et al.** The prevalence of intestinal parasites in the province of Izmir, Turkey. *Parasitol Res* 2008; 103:839-45. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-1065-6
20. **Yaman O, Yazar S, Özcan H, ve ark.** 2005-2008 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2008; 32:266-70.
21. **Ataş AD, Kuşcuoğlu S.** Tokat Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda Ocak 2007-Aralık 2009 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34:161-5.
22. **Değerli S, Özçelik S, Çeliksöz A.** Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2005; 29:116-9.
23. **Özçakır O, Güreser S, Ergüven S, Yılmaz Akyön Y, Topaloğlu R, Hasçelik G.** Türkiye'deki bir üniversite hastanesinde *Blastocystis hominis* enfeksiyonunun karakteristiği. *Türkiye Parazitol Derg* 2007; 31:277-82.
24. **Girginkardesler N, Coskun S, Balcioglu IC, Ertan P, Ok UZ.** Dientamoeba fragilis, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:110-3. http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00504.x
25. **Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM.** Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:581-5. http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000600007

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(2):82-87, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.082

Araştırma

Yoğun İnce Benekli (DFS) Paterninde Antinükleer Antikor Varlığı Tespit Edilen Hastaların ICD Kodlarının Retrospektif Olarak Araştırılması[§]

Erhan KONGUR, Neşe KAKLIKKAYA, Gülçin BAYRAMOĞLU, Esra ÖZKAYA, Şükran ÖNDER, Rukiye AKYOL, Bünyamin KASAP

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Sistemik dolaşımda anti-nükleer antikorların (ANA) varlığının tespiti birçok otoimmün hastalığın tanısı için anahtar rol oynamaktadır. Ancak indirekt immünofloresan (IIF) tarama testlerinde sıkça karşılaşılan ve anti-DFS70 antikorlarının varlığı ile ilişkilendirilebilen yoğun ince benekli (dense fine spekled, DFS) ANA paterninin hastalıklar ile ilişkili olup olmadığı henüz netleşmemiştir. Bu çalışmada, DFS paterninde ANA varlığı ile hastaların klinik tanıları ya da semptomları arasındaki ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *ANA-IIF tarama testinde DFS paterni varlığı belirlenen 200 hasta çalışmaya dâhil edilmiştir. Hastaların klinik bilgilerinin elde edilmesi amacıyla hastaların hekimleri tarafından belirlenen International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) kodları retrospektif olarak incelenmiştir.*

Bulgular: *DFS paterninde ANA varlığı tespit edilen hastaların 158'i (%79.0) kadın, 42'si (%21.0) erkektir. Bu antikorlar en sık 1-10 yaş (58 hasta, %29.0), en az 71-80 yaş aralığında (bir hasta, %0.5) olan hastalarda tespit edilmiş, yaş ilerledikçe görülme sıklığının azaldığı belirlenmiştir. Hastaların 26'sında (%13.0) sistemik otoimmün romatizmal hastalık (SORH), sekizinde (%4.0) organa spesifik otoimmün hastalık, dokuzunda (%4.5) malignensi tanısı konduğu, 127 hastanın (%63.5) ise çeşitli sistemlere ait farklı hastalıklar, semptomlar ya da tanımlamalar içeren ICD kodları ile takip edildiği görülmüştür. Hastaların 30'unda (%15.0) ICD kodu belirtilmemiştir.*

Sonuç: *Bu çalışmada DFS paternindeki ANA pozitifliğinin kadın hastalarda ve erken çocukluk evrelerinde daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Spesifik bir hastalık ile ilişkilendirilemese de bu paternin SORH'da da pozitif olabileceği, bu nedenle DFS paterninde ANA varlığı tespit edilen hastaların klinik bulgular eşliğinde değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.*

Anahtar kelimeler: *Antinükleer antikor, DFS paterni, ICD kodları*

SUMMARY

Retrospective Investigation of ICD Codes of Patients with Dense-Fine Speckled (DFS) Pattern Antinuclear Antibodies

Objective: *Determination of the presence of antinuclear antibodies (ANA) in systemic circulation has a key role in diagnosis of many autoimmune diseases. However, it has still not been clear whether dense fine speckled (DFS) pattern of ANA, which are commonly found in indirect immunofluorescence (IIF) screening tests indicating the presence of anti-DFS70 antibodies, are related with the diseases. The aim of this study was to investigate the association between clinical diagnosis of patients with the presence of DFS pattern of ANA.*

Material and Methods: *Two hundred patients with presence of DFS pattern on ANA-IIF screening test were included in the study. To obtain the clinical data of the patients, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) codes, which were determined by physicians of the patients, were retrospectively analyzed.*

Results: *Of the patients with DFS pattern of ANA, 158 (79.0%) were women and 42 (21.0%) were men. These antibodies were found most frequently in age range of 1-10 (58 patients, 29.0%), and the least in age range of 71-80 (one patient, 0.5%), and it was determined that the frequency decreased as the age increased. Of the patients 26 (13.0%) were diagnosed as systemic autoimmune rheumatic diseases (SARD), eight (4.0%) as organ-specific autoimmune diseases, nine (4.5%) as malignancy, and 127 (63.5%) were followed-up due to different diseases of various systems. No clinical diagnosis was indicated in 30 (15.0%) patients.*

Conclusion: *As a result, although it could not be associated with a specific disease, DFS pattern of ANA may be positive in SARD. Therefore, it is concluded that the patients with DFS pattern of ANA should be evaluated together with clinical findings.*

Keywords: *Antinuclear antibody, DFS pattern, ICD codes*

Alındığı tarih: 30.06.2016
Kabul tarihi: 18.08.2016
Yazışma adresi: Neşe Kaklıkkaya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 61080 Trabzon
e-posta: nkkaya@yahoo.com
[§] Bu çalışma 18-22 Kasım 2015 tarihleri arasında düzenlenen 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

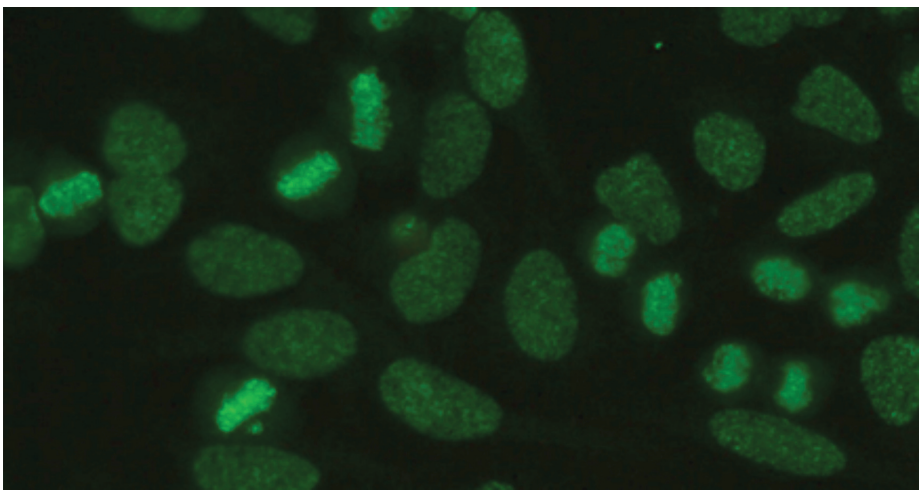
Sistemik dolaşımda anti-nükleer antikorların (ANA) varlığının tespiti birçok otoimmün hastalığın tanısı için anahtar rol oynamaktadır[1]. HEp-2 hücreleri kullanılarak uygulanan indirekt immünofloresan (IIF) yöntemi ANA taranmasında altın standart olarak önerilmektedir[2].

HEp-2 hücrelerinde oluşan boyanma paternlerinin değerlendirilmesi ve isimlendirilmesinde standardizasyon sağlanabilmesi için uluslararası uzlaşı raporları yayınlanmıştır. Değerlendirmeler bu raporlar eşliğinde yapılmaktadır. HEp-2 hücrelerinde oluşan birçok boyanma paterni belli antinükleer antijenlere karşı oluşan otoantikorları işaret ederken, bu otoantikorların birçoğunun hangi hastalık ya da hastalıklar ile ilişkili olduğu kanıtlanmamıştır[3].

ANA tarama testlerinde sıkça karşılaşılan yoğun ince benekli (*dense fine spekled*, DFS) paterni interfaz safhasındaki HEp-2 hücrelerinin nükleoplazmalarının ve metafaz safhasındaki hücrelerin kromozomal alanlarının çok yoğun, heterojen benekli boyanması ile tanımlanan bir ANA paternidir. İnterfaz safhasındaki nükleoplazmalarda beneklerin büyüklük, parlaklık ve yoğunluklarının farklılıklar göstermesi de bu paternin önemli bir ayırdedici özelliğidir[3] (Şekil 1).

DFS paterni DFS70, *lens epithelium-derived growth factor* (LEDGF) ya da *DNA binding transcription coactivator* p75 olarak isimlendirilen, 70 kd'luk proteine karşı oluşan otoantikorların (anti-DFS70) varlığı ile ilişkilendirilmiştir[4,5]. Hücresel streslere direnç sağlayan, yaşamsal bir protein olan DFS70 birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Lens epitelinde varlığı gösterilen, prostat tümör dokularından bol miktarda eksprese edildiği belirtilen bu proteininin birçok hücre için yaşamsal önemi olduğu, ayrıca viral integraz ile etkileşime girerek insan immün yetmezlik virüsünün (HIV'ın) replikasyonunda kofaktör olarak görev yaptığı gösterilmiştir[6-8].

DFS paterni ve ilişkili olduğu anti-DFS70 antikorlarının klinikle ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır. Anti-DFS70 antikorları ilk olarak interstisyel sistitli hastalarda gösterilmiştir. Bu antikorların özellikle atopik dermatit başta olmak üzere çeşitli inflamatuvar hastalıklarda, alopesia areata, astım, çeşitli göz hastalıkları ve kanserlerde görülebildiğine dair çalışmalar mevcuttur[7-14]. Yapılan çalışmalarda, anti-DFS70 antikorlarının sağlıklı bireylerde de değişken oranlarda pozitif bulunduğu görülmüştür[15,16]. Anti-DFS70 antikorları pozitifliğinin sistemik otoimmün romatizmal hastalıkların (SORH) tanısından uzaklaştırdığına dair çalışmalar da mevcuttur[16-18].



Şekil 1. İndirekt immünfloresan testinde DFS paterninin görünümü.

Bu çalışmada DFS paterninde ANA varlığı tespit edilen hastaların klinik tanılarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Hasta Hizmetleri Laboratuvarına 01.10.2012 - 01.10.2015 tarihleri arasında ANA-IIF testi istemi ile gönderilen ve DFS paterninde ANA varlığı belirlenen 200 hasta dâhil edildi. ANA varlığının belirlenmesi için Antibodies against cell nuclei (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test kitleri kullanıldı. Hasta serumları 1/100 oranında dilüe edilerek çalışıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılan test iki farklı araştırmacı tarafından, birbirlerinden bağımsız şekilde, immünofloresan mikroskop (Euroimmun, Lübeck, Almanya) kullanılarak değerlendirildi. DFS paterni, HEp-2 hücrelerinin nükleoplazmalarının ve metafaz safhasındaki hücrelerin kromozomal alanlarının yoğun, heterojen benekli boyanması, beneklerin büyüklük, parlaklık ve yoğunluklarının farklılıklar göstermesi ile tanımlandı. Beraberinde farklı ANA paterni tespit edilen örnekler çalışma dışı bırakıldı.

Hastaların yaş ve cinsiyet bilgileri kaydedildi. Klinik bilgilerinin araştırılması amacıyla hekimleri tarafından belirlenen *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD) kodları retrospektif olarak incelendi.

Tablo 1. DFS paterni tespit edilen hastaların yaşlarının dağılımı.

Yaş	Sayı	%
1-10	58	29.0
11-20	43	21.5
21-30	29	14.5
31-40	19	9.5
41-50	20	10.0
51-60	24	12.0
61-70	6	3.0
71-80	1	0.5
Toplam	200	100

BULGULAR

Hastaların 158'i (%79.0) kadın, 42'si (%21.0) erkek idi. Hastaların dekadlara göre yaş dağılımı Tablo 1'de belirtilmiştir.

Hastaların 26'sında (%13.0) SORH, sekizinde (%4.0) organa spesifik otoimmün hastalık, dokuzunda (%4.5) malignensi varlığı belirlendi. Hastaların 127'sinin (%63.5) ise çeşitli sistemlere ait farklı hastalıklar, semptomlar ya da tanımlamalar nedeni ile takip edildiği görüldü. Otuz hastanın (%15.0) ICD koduna ulaşılamadı. En sık rastlanan ICD kodunun eklem ağrısı olduğu görüldü (44 hasta, %22.0) (Tablo 2).

TARTIŞMA

Çalışmamızda DFS paternine sahip hastaların çoğu (%79.0'ı) kadın hastalardan oluşmaktadır. Kang ve ark.'nın[19] çalışmasında DFS paterni pozitif olan hastaların 80'inin (%79.2) kadın, 21'inin (%20.8) ise erkek hastalardan oluşmakta olduğu görülmüştür. Şener ve ark.'nın[20] yaptığı çalışmada ise, DFS paterni görülen hastaların %68.75'inin kadın, %31.25'inin erkek olduğu belirtilmiştir. Otoimmün hastalıkların kadınlarda erkeklere göre daha sık görüldüğü bilinmektedir[21]. Oranların kadın hastalarda oldukça yüksek olması bu hastaların otoimmün hastalık yönünden taranması gerektiğini düşündürmektedir.

DFS paterni en sık 1-10 yaş (58 hasta, %29.0), en az 71-80 yaş (bir hasta, %0.5) aralığındaki hastalarda tespit edilmiş. Yaş ilerledikçe DFS paterni görülme sıklığının azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar da diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur[13,19]. Schmeling ve ark.[22] yaptıkları çalışmada çocukluk yaş gruplarında DFS70 antikorlarının bazı sistemik otoimmün hastalıkları işaret edebileceğini belirtmişlerdir.

Tablo 2. DFS paterni tespit edilen hastaların klinik tanıları.

Klinik tanı	DFS paterni pozitif örnek sayısı	
	n	(%)
Sistemik otoimmun romatizmal hastalıklar		
Sistemik lupus eritematozus	16	(8.0)
Romatoid artrit	6	(3.0)
Sjögren sendromu	1	(0.5)
Sistemik skleroz	1	(0.5)
Jüvenil romatoid artrit	2	(1.0)
Organa spesifik otoimmün hastalıklar		
Multipl skleroz	4	(2.0)
Otoimmun tiroidit	2	(1.0)
Otoimmun hepatit	1	(0.5)
Ülseratif kolit	1	(0.5)
Malign hastalıklar		
Karsinoma in situ	5	(2.5)
Malign neoplazm	3	(1.5)
Sindirim sistemi malign neoplazmı	1	(0.5)
Diğer romatizmal hastalıklar		
Fibromyalji	2	(1.0)
Ankilozan spondilit	2	(1.0)
Birikim hastalıkları		
Herodofamilyal amiloidozis	2	(1.0)
Sarkoidoz	2	(1.0)
Göz hastalıkları		
İridosiklit	1	(0.5)
Episklerit	1	(0.5)
Pitozis	1	(0.5)
Üriner sistem hastalıkları		
Üriner sistem enfeksiyonu	3	(1.5)
Sistit	1	(0.5)
Üriner taş	1	(0.5)
Akut böbrek yetmezliği	1	(0.5)
Nefrotik sendrom	2	(1.0)
Karaciğer hastalıkları		
Kronik hepatit	1	(0.5)
Kronik hepatit C	2	(1.5)
Toksik karaciğer hastalığı	1	(0.5)
Deri hastalıkları		
Ürtiker	7	(3.5)
Dermatit	1	(0.5)
Kserozis kutis	1	(0.5)
Raynaud sendromu	1	(0.5)
Vasküler hastalıklar		
Periferik vasküler hastalık	1	(0.5)
Serebrovasküler hastalık	1	(0.5)
Hematolojik hastalıklar		
Demir eksikliği anemisi	2	(1.0)
İdiopatik trombositopenik purpura	1	(0.5)
Solunum sistemi hastalıkları		
Astım	6	(3.0)
İnterstisyel pulmoner hastalık	1	(0.5)
Allerjik rinit	1	(0.5)
Nörolojik hastalıklar		
Motor nöron hastalığı	1	(0.5)
Polinöropati	2	(1.0)
Vertigo	2	(1.0)
Endokrin hastalıklar		
Toksik olmayan multinodüler guatr	1	(0.5)
Endokrin bozukluk	1	(0.5)
Diğer		
Eklem ağrısı	44	(22.0)
Baş ağrısı	4	(2.0)
Karın ağrısı	3	(1.5)
Allerji	3	(1.5)
Düşük	1	(0.5)
Öksürük	1	(0.5)
Rutin çocuk sağlığı muayenesi	4	(2.0)
Sinovit	1	(0.5)
Tekrarlayan oral aftlar	1	(0.5)
Transaminaz ve laktat dehidrogenaz yüksekliği	3	(1.5)
Lökosit bozuklukluğu	3	(1.5)
Koagülasyon bozukluğu	1	(0.5)
Deri döküntüsü	5	(2,5)
Karaciğer hastalığı	1	(0.5)
Belirsiz	30	(15.0)
Toplam	200	(100.0)

Mariz ve ark.'nın[17] 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada, anti-DFS70 antikorlarına sahip 39 sağlıklı bireyin uzun dönem sonuçları ve prognozları (ortalama dört yıllık klinik takip) incelendiğinde hiçbirinde SORH gelişmediği görülmüş ve anti-DFS70 antikorlarının sistemik lupus eritematosus (SLE) gibi SORH'ların tanısının dışlanmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise 26 (%13.0) SORH tanısı alan hastada DFS paterninin varlığı görülmüştür.

Mutlu ve ark.'nın[23] çalışmasında, DFS paternine sahip 74 hastanın aldığı tanılar incelenmiş, 68 hastanın (%91.9) hiçbir SORH'a sahip olmadıkları görülmüş, diğer altı hastanın (%8.1) üçünün (%4.0) SLE, ikisinin (%2.7) Sjögren sendromu ve birinin (%1.4) de skleroderma tanısına sahip oldukları saptanmıştır. Lee ve ark.'nın[24] 2016 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada, IIF ile DFS paterni pozitif bulunan 181 hastanın 31'inin (%17.1) SORH tanısı aldığı görülmüş, SORH tanısı alan 19 hastanın (%10.5) SLE, beş hastanın (%2.8) miks konnektif doku hastalığı, beş hastanın (%2.8) Sjögren sendromu, bir hastanın (%0.6) sistemik skleroz, bir hastanın da (%0.6) polimiyozit/dermatomiyozit tanısı aldıkları görülmüştür. Çalışmamızda ise DFS paternine sahip 200 hastanın 26'sında (%13.0) SORH tanısı konulduğu görülmektedir. Bu hastaların 16'sı (%8.0) SLE, altısı (%3.0) romatoid artrit, ikisi (%1.0) jüvenil romatoid artrit, biri (%0.5) Sjögren sendromu ve biri (%0.5) sistemik skleroz tanısı almıştır.

Şener ve ark.'nın[20] yaptıkları başka bir çalışmada DFS paternine sahip 16 hastanın klinik tanıları araştırılmış ve bu 16 hastanın birinde (%6.25) SORH varlığı görülmüştür. Diğer hastaların aldıkları tanılara bakıldığında üç hastanın (%18.75) tiroidit, birer hastanın (%6.25) toksik hepatit, kronik hepatit B, diyabet, hemolitik anemi, anemi, anemi + dermatit, diyabet + dermatit, sistit, Behçet hastalığı, fibromiyalji, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve konnektif doku hastalığına sahip oldukları gözlenmiştir. Çalışmamızda, Şener ve ark.'nın[20] çalışmasının aksine tiroidit tanısı alan hasta oranı daha düşük seviyelerde seyretmektedir. Çalışmamızda yalnızca, iki hastanın (%1.0) otoimmün tiroidit tanısı aldığı görülmektedir. Lee ve ark.'nın[24] çalışmasında ise otoimmün tiroidit tanısı alan iki hasta (%1.1) görülmüştür.

Lee ve ark.'nın[24] çalışmasında, 33 hastanın (%18.2) dermatit tanısı aldığı görülmüştür. Şener ve ark.'nın[20] çalışmasında dermatit tanısı alan bir (%6.25), dermatit + anemi tanısı alan bir hastanın (%6.25) olduğu görülmekte iken, bizim çalışmamızda 200 hastanın yalnızca birinde (%0.5) dermatit tanısına rastlanmıştır.

Fibromiyalji tanısına sahip olan hastaların sayısı Lee ve ark.'nın[24] çalışmasında, yedi (%3.9), Şener ve ark.'nın[20] çalışmasında bir (%6.25), bizim çalışmamızda ise iki (%1.0) olarak bulunmuştur.

Şener ve ark.'nın[20] çalışmasında hiçbir hastanın kanser tanısı almadığı görülürken Lee ve ark.'nın[24] çalışmasında, yedi hastanın (%3.9) kanser tanısı aldığı saptanmıştır. Çalışmamızda ise kanser tanısı alan dokuz hastaya (%4.5) rastlanmıştır.

Çalışmamızda, farklı sistemleri ve farklı organları ilgilendiren birçok hastalıkta da DFS paterninde ANA varlığı tespit edilmiştir. Bu hastalıklar arasında en sık rastlanan, altı hastada tespit edilen (%3.0) astım olmuştur.

Çalışmaya alınan hastaların 75'inde (%37.5) eklem ağrısı, baş ağrısı, karın ağrısı, lökosit bozukluğu, koagülasyon bozukluğu, transaminaz yüksekliği, karaciğer hastalığı, deri döküntüsü, öksürük gibi ICD kodlarına da rastlanmıştır. Bu semptom ya da tanımlamalar çok farklı hastalıkların göstergeleri olabilmektedirler. Ayrıca 30 hastanın (%15.0) ICD kodlarına ulaşı-

lamamıştır. Bu hastaların kesin tanılarının konulamamış olması bu çalışmanın kısıtlılığını oluşturmaktadır. Hastaların 44'ünde (%22.0) eklem ağrısına ait ICD kodu olduğu görülmüştür. Eklem ağrısı belli bir hastalığa spesifik bir semptom olmayıp, otoimmün romatizmal hastalıkların da içinde bulunabildiği çok farklı hastalıkların varlığını gösterebilmektedir.

Çalışmada anti-DFS70 antikorlarının varlığının monospesifik bir test ile doğrulanamamış olması çalışmanın başka bir kısıtlılığı olarak görülmektedir. Ancak elde edilen sonuçlar daha sonra yapılacak daha ayrıntılı çalışmalar için bir veri tabanı oluşturacaktır.

Bu çalışmada, DFS paternindeki ANA pozitifliğinin kadın hastalarda ve erken çocukluk evrelerinde daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Spesifik bir hastalık ile ilişkilendirilemese de SORH'da da pozitif olabileceği, bu nedenle DFS paterninde ANA varlığı tespit edilen hastaların klinik bulgular eşliğinde değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Peng SL, Craft JE.** Antinuclear antibodies. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, Mclnnes IB, O'Dell JR eds. Kelley's Textbook of Rheumatology. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2012:789-803.
2. **Meroni PL, Schur PH.** ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420-22. http://dx.doi.org/10.1136/ard.2009.127100
3. **Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, et al.** Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015; 6:412. http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00412
4. **Ge H, Si Y, Roeder RG.** Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J* 1998; 17:6723-9. http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.22.6723
5. **Shinohara T, Singh DP, Fatma N.** LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21:341-58. http://dx.doi.org/10.1016/S1350-9462(02)00007-1
6. **Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, et al.** LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278:33528-39. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M303594200
7. **Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, et al.** Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS70-positive subjects. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1107:174-83. http://dx.doi.org/10.1196/annals.1381.019
8. **Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, et al.** Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* 2005; 62:14-26. http://dx.doi.org/10.1002/pros.20112
9. **Broadfoot A, Sivertsen T, Baumgart K.** Dense fine speckled indirect immunofluorescence pattern in an Australian population. *Pathology* 2016; 48:247-50. http://dx.doi.org/10.1016/j.pathol.2016.02.002
10. **Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EK, Tan EM.** Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1211-20. http://dx.doi.org/10.1067/mai.2000.107039
11. **Ganapathy V, Casiano CA.** Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us? *Arthritis Rheum* 2004; 50:684-88. http://dx.doi.org/10.1002/art.20095
12. **Ayaki M, Ohoguro N, Azuma N, et al.** Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity* 2002; 35:319-27. http://dx.doi.org/10.1080/0891693021000003198
13. **Okamotoa M, Ogawaa Y, Watanabe A, et al.** Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J Autoimmun* 2004; 23:257-66. http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2004.07.004
14. **Yamada K, Senju S, Shinohara T, et al.** Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol Lett* 2001; 78:161-68. http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478(01)00243-7
15. **Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al.** Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum* 2004; 50:892-900. http://dx.doi.org/10.1002/art.20096
16. **Mahler M, Parker T, Peebles CL, et al.** Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2012; 39:2104-10. http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.120598
17. **Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE.** Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011; 63:191-200. http://dx.doi.org/10.1002/art.30084
18. **Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y.** High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody-positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus* 2008; 17:171-6. http://dx.doi.org/10.1177/0961203307086311
19. **Kang SY, Lee WI.** Clinical significance of dense fine speckled pattern in anti-nuclear antibody test using indirect immunofluorescence method. *Korean J Lab Med* 2009; 29:145-51. http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.2.145
20. **Şener AG, Afşar İ.** Frequency of dense fine speckled pattern in immunofluorescence screening test. *Eur J Rheumatol* 2015; 2:103-5. http://dx.doi.org/10.5152/eurjrheum.2015.0003
21. **Owen JA, Punt J, Stranford SA.** Kuby Immunology. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Co, 2013, 517-52.
22. **Schmeling H, Mahler M, Levy DM, et al.** Autoantibodies to dense fine speckles in pediatric diseases and controls. *J Rheumatol* 2015; 42:2419-26. http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.150567
23. **Mutlu E, Eyigör M, Mutlu D, Gültekin M.** Confirmation of anti-DFS70 antibodies is needed in routine clinical samples with DFS staining pattern. *Cent Eur J Immunol* 2016; 41:6-11. http://dx.doi.org/10.5114/ceji.2016.58812
24. **Lee H, Kim Y, Han K, Oh EJ.** Application of anti-DFS70 antibody and specific autoantibody test algorithms to patients with the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells. *Scand J Rheumatol* 2016; 45:122-8. http://dx.doi.org/10.3109/03009742.2015.1060260

Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(2):88-96, 2016
doi:10.5222/TMCD.2016.088

Araştırma

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında CTX-M Enzimlerinin Belirlenmesi

Esra DENİZ ÖGEDEY*, Füsun CÖMERT*, Füruzan KÖKTÜRK, Canan KÜLAH*, Elif AKTAŞ***

**Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

***Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı*

ÖZET

Amaç: *Bu çalışmada, hastanemize başvuran hastalardan etken olarak izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella spp. izolatlarının, GSBL üretiminin ve CTX-M enzim tiplerinin araştırılması amaçlandı.*

Gereç ve Yöntem: *Haziran-Aralık 2009 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden toplam 593 izolat çalışmaya dâhil edildi. Antibiyotik duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. GSBL üretimi çift disk sinerji ve E test ile doğrulandı. GSBL üreten izolatlar için sefotaksim minimal inhibitör konsantrasyonları agar dilüsyon ile belirlendi. İzolatlarda polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle CTX-M enzim grupları (CTX-M grup, CTX-M-1 grubu, CTX-M-2 grubu, CTX-M-8 grubu, CTX-M-9 grubu, CTX-M-25 grubu) araştırıldı.*

Bulgular: *İzolatların %33.7'sinin (200/593) GSBL ürettiği (E. coli %34.3, K. pneumoniae %31.3) belirlendi. Yatan hastalardan izole edilen izolatlarda GSBL üretimi anlamlı olarak yüksek bulundu. GSBL üreten izolatlar diğer izolatlara göre, siprofloksasin, levofloksasin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam, gentamisin, amikasin, tobramisin, trimetoprim-sülfometoksazol ve nitrofurantoine anlamlı olarak dirençli bulundu. GSBL üreten izolatların 192'sinde (%96) CTX-M enzimi belirlendi. CTX-M ürettiği saptanan izolatların %96.8'inde (186/192) CTX-M-1 grubu %5.2'sinde (10/192) CTX-M-2 grubu, %1'inde (2/192) CTX-M-8 grubu ve %1.5'unda (3/192) CTX-M-9 grubu saptandı. CTX-M-1 grubu GSBL ürettiği belirlenen 186 izolatın 165'inde (%88.7) CTX-M-15 enzim tipi saptandı.*

Sonuç: *Hastanemizden elde edilen izolatlarda GSBL oranları oldukça yüksek bulunmuş olup, en sık enzim grubu CTX-M-1 grubu ve en sık enzim tipi CTX-M-15 enzimi olarak saptanmıştır.*

Anahtar kelimeler: *CTX-M, Escherichia coli, GSBL, Klebsiella spp.*

SUMMARY

Detection of CTX-M Enzymes in ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamases) Producing Escherichia coli and Klebsiella spp Isolates

Objective: *The aim of this study is to evaluate ESBL production and CTX-M enzyme types in Escherichia coli and Klebsiella spp isolates obtained from patients admitted to our hospital.*

Material and Method: *A total of 593 isolates from various clinical specimens of patients between June 2009 and December 2009 were included in the study. Antibiotic susceptibility test was performed by Kirby-Bauer disk diffusion method. ESBL production was confirmed by double-disc synergy and E tests.The minimal inhibitory concentrations of cefotaxim for the isolates with ESBL were detected by agar dilution method. Polymerase chain reaction was used to determine the CTX-M enzyme types including CTX-M group, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8 group, CTX-M-9 group, CTX-M-25 group, CTX-M-15, CTX-M-3, and CTX-M-10 types.*

Results: *ESBL production was found in 33.7% (200/593) of the isolates (34.3% for E. coli and 31.3% for Klebsiella isolates). ESBL production was significantly high in isolates from inpatients. Resistance to ciprofloxacin, levofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, gentamicin, amikacin, tobramycin, trimetoprim-sulphametoxazol and nitrofurantoin was significantly higher in ESBL producing isolates. CTX-M enzymes were found in 192 (96%) of the 200 ESBL producing isolates. Of the CTX-M producing isolates, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 and CTX-M-9 groups were found in 96.8% (186/192), 5.2% (10/192), 1% (2/192) and 1.5% (3/192), respectively. CTX-M-15 was found in 165 of the 186 (88.7%) CTX-M-1 group ESBL producing isolates.*

Conclusions: *High rates of ESBL production was found among the isolates in our hospital. The most common enzyme type was CTX-M-1 group, CTX-M-15 being the most common enzyme type.*

Key words: *CTX-M, Escherichia coli, ESBL, Klebsiella spp.*

Alındığı tarih: 22.06.2016
Kabul tarihi: 26.08.2016
Yazışma adresi: Füsun Cömert, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak
Tel: (0372) 261 24 32
e-posta: fusbeg@yahoo.com

GİRİŞ

CTX-M enzimleri günümüzde dünya çapında en yaygın geniş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) hâline gelmişlerdir. CTX-M grubu beta-laktamazlar, substrat olarak sefotaksimi tercih eden enzimlerdir. Bu enzimler seftazidimi de bir miktar hidroliz etmekle birlikte, bu etki klinikte direnc yol açacak kadar önemli değildir. Ayrıca CTX-M enzimlerinin önemli bir özelliği de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik asit ve sulbaktama göre fazla olmasıdır. Günümüzde CTX-M ailesinde beş farklı grup ve 40 farklı enzim bulunmaktadır. CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olarak isimlendirilen bu beş grup, aminoasit dizileri esas alınarak tanımlanmıştır. CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-2 bu grupların içinde yer alan en yaygın enzimlerdir. CTX-M-9 ve CTX-M-14 İspanya'da, CTX-M-1 İtalya'da, CTX-M-2 pek çok Güney Amerika ülkesinde, Japonya'da ve İsrail'de, CTX-M-15 ise dünya çapında saptanmıştır[1,2]. Ülkemizde bu konuda çok az sayıda çalışma mevcut olup, yapılan çalışmalarda en sık saptanan CTX-M enzimleri; CTX-M-15, CTX-M-3 ve CTX-M-1 olmuştur[3-6].

Bu çalışmada, hastanemize başvuran hastalardan etken olarak izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık durumlarının belirlenmesi, GSBL üretiminin ve CTX-M enzim tiplerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar ve antibiyotik duyarlılık testleri

Haziran-Aralık 2009 tarihleri arasında, çeşitli klinik örneklerden elde edilen 593 izolat çalışmaya dâhil edildi. Bakteri tanımlaması geleneksel yöntemlerle yapıldı[7]. Geleneksel yöntemlerle tanımlanamayan bakteriler BBL Crystal Identification Systems E/NF (Becton Dickinson, ABD) tanımlama kiti ile tanımlandı.

Antibiyotik duyarlılık testleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. GSBL üretimini doğrulaması çift disk sinerji yöntemi ve gerektiğinde E test ile yapıldı[8]. GSBL ürettiği belirlenen izolatların sefotaksim için minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) CLSI önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi[9].

Moleküler yöntemler

GSBL üreten izolatlardan DNA eldesi kaynatma yöntemi ile yapıldı[10]. CTX-M enzim tiplerinin varlığı daha önce belirtilmiş olan primer çiftleriyle araştırıldı[11-14] (Tablo 1). Amplifikasyon için Gene Amp PCR System 9700 Termal Cycler (Applied Biosystems, Singapur) cihazı kullanıldı. Amplifikasyon ürünlerinin görüntülemesi,

Tablo 1. CTX-M enzimlerinin çoğaltılması için kullanılan primerler dizileri.

Enzim tipi	Forward Primer	Reverse Primer	Bant Büyüklüğü (bç)	Kaynak
CTX-M Grubu	5'-tttgcgatgtgcagtaccagtaa-3'	5'-cgatatcgttggtggtgccata-3'	544	(11)
CTX-M Grup 1	5'-aaaaatcactgcgccagttc-3'	5'-agcttattcatcgccacgtt-3'	415	(12)
CTX-M Grup 2	5'-cgacgctacccctgctatt-3'	5'-ccagcgtcagatttttcagg-3'	552	(12)
CTX-M Grup 8	5'-tcgcgttaagcggatgatgc-3'	5'-aacccacgatgtgggtagc-3'	666	(12)
CTX-M Grup 9	5'-caaagagagtgcaacggatg-3'	5'-attggaaagcgttcatcacc-3'	205	(12)
CTX-M Grup 25	5'-gcacgatgacattcggg-3'	5'-aacccacgatgtgggtagc-3'	327	(12)
CTX-M-3	5'-cgtcacgctgttgttaggaa-3'	5'-acggctttctgccttaggtt-3'	780	(13)
CTX-M-15	5'-cacacgtggaatttagggact-3'	5'-gccgtctaaggcgataaaca-3'	996	(11)
CTX-M-10	5'-ccgcgctacactttgtgg-3'	5'-ttacaaaccgttggtgacg-3'	962	(14)

Tablo 2. GSBL üreten izolatların antibiyotik direnç durumları.

	E. coli (n%)		*K. pneumoniae* (n %)	
Antibiyotik	**DİR (plk)**	**DİR (yatan)**	**DİR (plk)**	**DİR (yatan)**
Siprofloksasin	45 (84.9)	96 (82.8)	7 (77.8)	15 (71.4)
Levofloksasin	44 (83.0)	94 (81.0)	6 (66.7)	14 (66.7)
Ampisilin	53 (100)	116 (100)	9 (100)	21 (100)
Amoksisilin klavulonat	27 (50.9)	85 (73.3)	5 (55. 6)	10 (47.6)
Piperasilin tazobaktam	1 (16.7)	22 (43.1)	0 (0)	3 (33.3)
Sefalotin	53 (100)	116 (100)	0 (0)	21(100)
Sefepim	45 (84.9)	98 (84.5)	8 (88.9)	16 (76.2)
Sefuroksim	53 (100)	116 (100)	8 (88.9)	21 (100)
İmipenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gentamisin	32 (60.4)	60 (51.7)	4 (44.4)	10 (47.6)
Amikasin	3 (5.7)	5 (4.3)	1 (11.1)	0 (0)
Tobramisin	41 (77.4)	96 (82.8)	6 (66.7)	13 (61.9)
Trimetoprim sülfometoksazol	38 (71.7)	67 (57.8)	9 (100)	19 (90.5)
Nitrofurantoin	10 (23.1)	10 (15.4)	4 (50.0)	6 (50.0)
Sefoksitin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sefotaksim	52 (98.1)	112 (96.6)	9 (100)	20 (95.2)
Seftriakson	52 (98.1)	112 (96.6)	9 (100)	20 (95.2)
Seftazidim	40 (75.5)	88 (75.9)	8 (88.9)	18 (85.7)
Aztreonam	45 (84.9)	106 (91.4)	9 (100)	20 (95.2)

DİR; Dirençli; plk: Poliklinik hastası

1X TBE tamponu içindeki %2'lik agaroz jelde (Sigma, Almanya) 120 V akımla 60 dakika elektroforez sonrası Gel Doc UV görüntüleme sistemi (BioRad, İtalya) ile yapıldı. Belirleyici (marker) olarak ise, 100-bç'lik DNA ladder (Bioron, Almanya) kullanıldı.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Versiyon 13.0) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak belirtildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arası farklılıklar ki-kare ve Fisher Kesin ki-kare testi ile incelendi. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

İzolatlar ve antibiyotik duyarlılıkları

İzolatların 492'si *Escherichia coli* ve 101'i *Klebsiella* spp. (96 *K. pneumoniae,* 5 *K. oxytoca*) olarak tiplendirildi. İzolatların elde edildiği hastaların 370'inin (%62.4) kadın, 223'ünün (%37.6) erkek ve yaş ortalamasının 53.0 (±24.6) olduğu bulundu. Klinik örneklerin 316'sının (%53.3) yatan hastalara, 277'sinin (%46.7) poliklinik hastalarına ait olduğu belirlendi.

Çalışmaya dâhil edilen izolatların 200'ünün (%33.7) GSBL ürettiği tespit edildi. GSBL üretiminin *E. coli* için %34.3 (169/492), *K. pneumoniae* için %31.3 (30/96) olduğu belirlendi. Yalnızca bir *K. oxytoca* (1/5) izolatında GSBL belirlendi. İzolatların %73.7'sinin idrar örneklerinden elde edildiği gözlendi. İzolatların hiçbirinde sefoksitin ve karbapenem direncine rastlanmadı. GSBL üreten izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 2'de gösterilmiştir. GSBL üreten bakterilerin %66.5'i (133/200) idrar örneklerinden elde edildi. GSBL ürettiği saptanan 200 izolatın 137'si (%68.5) yatan hastalardan ve 63'ü (%31.5) polikliniğe başvuran hastalardan izole edildi. Yatan hastalardan izole edilen bakterilerde GSBL üretimi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). GSBL üreten izolatların, diğer izolatlara göre, siprofloksasin, levofloksasin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasi-

Tablo 3. GSBL üreten izolatların sefotaksim MİK değerleri.

	>512	512	256	128	64	32	16	8	<8	Toplam
Bakteri	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**N**
E. coli	45 26.6	57 33.7	33 19.5	12 7.1	14 8.3	3 1.8	5 3.0	0 0.0	0 0.0	169
K. pneumoniae	4 13.3	4 13.3	11 36.7	5 16.7	3 10.0	1 3.3	2 6.7	0 0.0	0 0.0	30
K. oxytoca	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	1 0.0	1
Toplam	49	61	44	17	17	4	7	0	1	200

Tablo 4. CTX-M enzim tipleri ve bunların saptandığı bakterilerin dağılımı (n; %).

		CTX-M-1 grup							
	CTX-M	**CTX-M-15**	**CTX-M-3**	**CTX-M-10**	**CTX-M-2**	**CTX-M-8**	**CTX-M-9**	**CTX-M-25**	**Toplam**
E. coli	164 (97.3)	139 (82.2)	10	0	10 (5.9)	2 (1.2)	3 (1.8)	0	169
K. pneumoniae	28 (93.3)	26 (86.7)	1	0	0	0	0	0	30
K. oxytoca	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Toplam	192	165	11	0	10	2	3	0	200

Tablo 5. İzolatların CTX-M enzim tiplerine göre sefotaksim MİK değerleri.

	>512	512	256	128	64	32	16	8	<8	Toplam
Enzim tipi	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**n %**	**N**
CTX-M	49 25.5	61 31.8	44 22.9	17 8.9	15 7.8	1 0.5	5 2.6	0 0.0	0 0.0	192
CTX-M -1	48 25.8	61 32.8	39 21.0	17 9.1	15 8.1	1 0.5	5 2.7	0 0.0	0 0.0	186
CTX-M-2	1 10.0	3 30.0	6 60.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	10
CTX-M-8	2 100.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	2
CTX-M-9	0 0.0	0 0.0	1 33.3	1 33.3	1 33.3	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	3

lin/tazobaktam, gentamisin, amikasin, tobramisin, trimetoprim-sülfometoksazol ve nitrofurantoine anlamlı olarak daha dirençli oldukları saptandı (p<0.001).

GSBL ürettiği belirlenen 200 izolatın, sefotaksim için MİK sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir. *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında $MİK_{90}$ değeri >512 μg/ml olarak belirlendi.

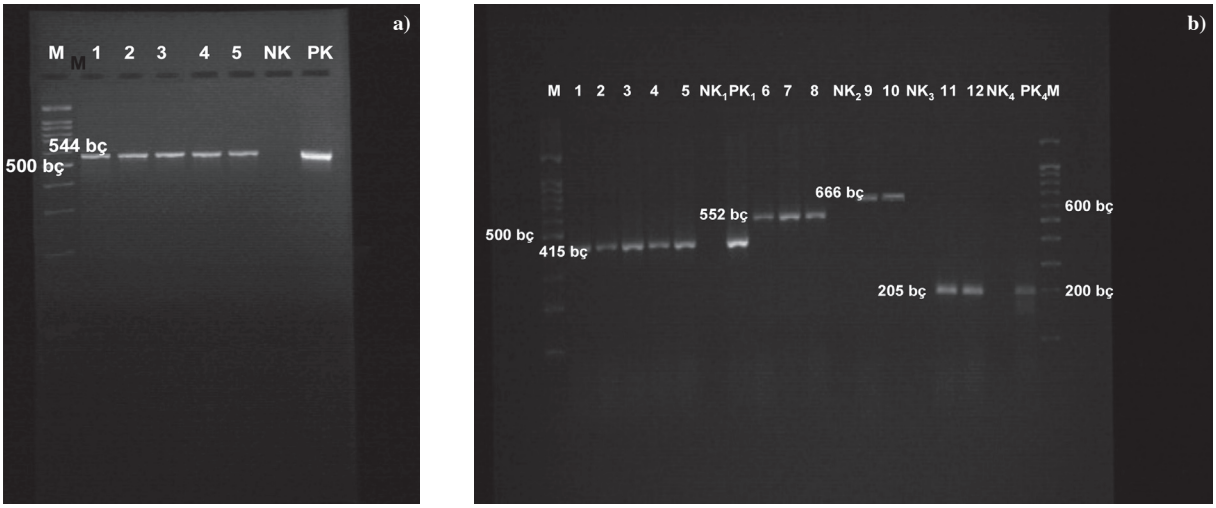
GSBL üreten izolatlarda saptanan CTX-M enzimleri

GSBL üreten 200 izolatın 192'sinde (%96) CTX-M enzimi bulunduğu belirlendi (Şekil 1a). CTX-M enzimi belirlenen izolatların %96.8'inde (186/192) CTX-M-1 grubu, %5.2'sinde (10/192) CTX-M-2 grubu, %1'inde (2/192) CTX-M-8 grubu ve %1.5'unda (3/192) CTX-M-9 grubu saptandı (Şekil 1b).

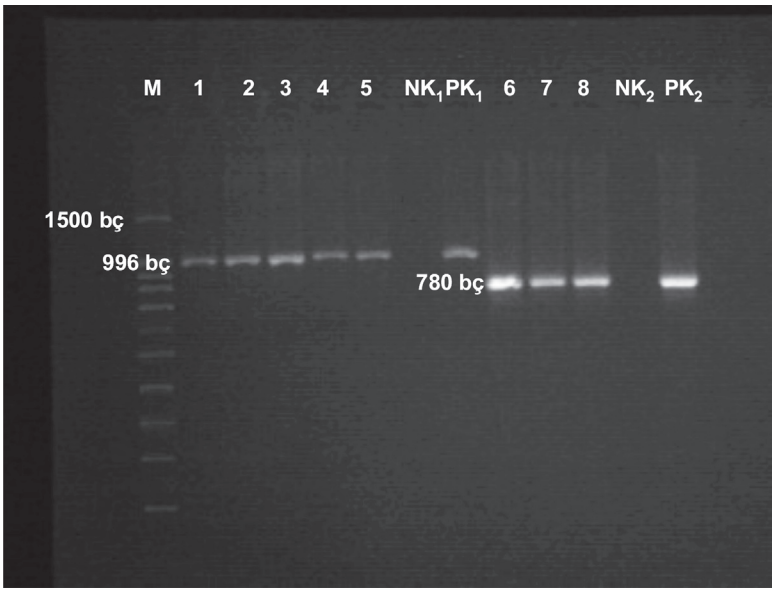
CTX-M-1 grubu GSBL ürettiği belirlenen 186 izolatın 165'inde (%88.7)

CTX-M-15, 11'inde CTX-M-3 varlığı belirlendi (Şekil 2). Mevcut primerle CTX-M-1 grubu bulunan izolatlardan onunda enzim alt grubu belirlenemedi (Tablo 4).

Sefotaksim direnci ve enzim tipleri ilişkisine bakıldığında, CTX-M-2 grubu enzim üreten izolatlarda sefotaksim MİK düzeyleri diğer enzimleri üreten bakterilere göre anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.001) (Tablo 5).



Şekil 1. PCR sonrası CTX-M enzimlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (a) 1-5: İzolatlarda çoğaltılan CTX-M (544 bç), NK: CTX-M negatif kontrol, PK: CTX-M pozitif kontrol, M: Marker (belirleyici) 100 bç+1.5kb DNA ladder. (b) 1-5: İzolatlarda çoğaltılan CTX-M-1 grubu (415 bç), NK1: CTX-M-1 grubu negatif kontrol, PK1: CTX-M-1 grubu pozitif kontrol, 6-8: İzolatlarda çoğaltılan CTX-M-2 grubu (552 bç), NK2: CTX-M-2 grubu negatif kontrol, 9,10: İzolatlarda çoğaltılan CTX-M-8 grubu (666 bç), NK3: CTX-M-8 grubu negatif kontrol, 11,12: İzolatlarda çoğaltılan CTX-M-9 grubu (205 bç), NK4: CTX-M-9 grubu negatif kontrol, PK4: CTX-M-9 grubu pozitif kontrol, M: Marker (belirleyici) 100 bç+1.5kb DNA ladder.



Şekil 2. PCR sonrası CTX-M-15 ve -3 enzimlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1-5: İzolatlarda çoğaltılan CTX-M-15 (996 bç), NK1: CTX-M-15 negatif kontrol, PK1: CTX-M-15 pozitif kontrol, 6-8: İzolatlarda çoğaltılan CTX-M-3 (780 bç), NK2: CTX-M-3 negatif kontrol, PK2: CTX-M-3 pozitif kontrol, M: Marker (belirleyici) 100 bç+1.5kb DNA ladder.

TARTIŞMA

Tüm dünyada, TEM ve SHV GSBL'ler, 1990'lı yıllar boyunca en yaygın enzim tipi olmuştur. İlk CTX-M enzimleri 1989'da izole edilen suşlarda belirlenmiş olmasına rağmen, bu enzimlerin yayılımı 1995'te başlamıştır[1]. CTX-M-15 enzimi, Fransa, İspanya, İngiltere gibi pek çok Avrupa ülkesinde sıklıkla saptanmıştır[15-18] ve doğusunda daha da fazla olmak üzere Avrupa'da en yaygın enzimdir. CTX-M-3 enzimi genellikle Doğu Avrupa ülkelerinde yaygındır[19,20]. Diğer CTX-M enzimleri bölgesel olarak gösterilmiş olup, CTX-M-9 ve 10 İspanya'da[21,22], CTX-M-14 Portekiz

ve İspanya'da[22-24], CTX-M-5 Beyaz Rusya ve Rusya'da[25], CTX-M-1 ise İtalya'da[26] yaygın olarak saptanmıştır. Amerika'da ise CTX-M enzimlerinin sporadik bildirimleri söz konusu olup, CTX-M-2'nin pek çok Güney Amerika ülkesinde yaygın olduğu gösterilmiştir[27-30].

Ülkemizde ilk CTX-M enzimi 1996-1997 yılları arasında ülkemizin de içinde bulunduğu yedi ülkenin (Amerika, Türkiye, Belçika, Avustralya, Güney Afrika, Tayvan, Arjantin) katıldığı bir çalışmada, kan kültürlerinden izole edilmiş *K. pneumoniae* izolatında bildirilmiştir. CTX-M-2, Türkiye'de belirlenen ilk CTX-M enzimi olmuştur[31]. Orta ve Doğu Avrupa'da sık görülen CTX-M enzimlerinin başında gelen CTX-M-15 enzimi ülkemizde ilk olarak 2001 yılında, yatan bir hastanın idrar örneğinden izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda bildirilmiştir[32]. 2000-2003 yıllarında Türkiye, Fransa, Hindistan ve Polonya'nın katıldığı bir çalışmada, ülkemizden gönderilen izolatlarda *(K. pneumoniae)* CTX-M-15 saptanmıştır[33]. Ülkemizde ilk CTX-M-3 bildirimi 2003 yılında bir *Shigella sonnei* suşunda yapılmıştır[34]. Bu tarihten sonra ülkemizden yapılan bildirimlere bakıldığında, CTX-M-15'nin yanı sıra CTX-M-3, CTX-M-1 bildirimleri gözlenmesine rağmen, ülkemizde CTX-M-15 baskın enzim tipidir[3,4,31-48]. Çalışmamızda, GSBL üreten izolatlarda CTX-M enziminin oranı, %96 (192/200) olarak saptanmıştır. İzolatlarımızdaki enzim dağılımına bakıldığında ülkemizdeki diğer çalışmalarla uyumlu şekilde, CTX-M-1 grubu enzimin en sık saptandığı (%96.8, 186/192) ve CTX-M-15'in dominant enzim (%88.7, 165/186) olduğu görülmektedir. Saptadığımız diğer CTX-M enzimleri CTX-M-2 grubu (%5.2, 10/192), CTX-M-8 grubu (%1, 2/192) ve CTX-M-9 grubu (%1.5, 3/192) olmuştur. Çalışmamıza göre CTX-M'e sahip izolatların %85.4'ünün (164/192) *E. coli*, %14.6'sının (28/192) ise *K. pneumoniae* olduğu saptanmıştır. Yumuk ve ark.[42] 3108 üriner sistem enfeksiyonlu hastadan izole ettikleri *E. coli* izolatlarının 70'inde (%21) GSBL saptamış olup, GSBL üreten *E. coli*'lerin %76.5'inde CTX-M enziminin bulunduğunu belirlemişler ve CTX-M-15 (%53) enziminin baskınlığını vurgulamışlardır. Aynı çalışmada CTX-M enzimini üreten izolatların %69'u, TEM ve SHV üreten izolatların ise %50'si siprofloksasine dirençli bulunmuştur[42]. Çelik ve ark.[43] tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmaya dâhil edilen toplumdan edinilmiş üst üriner sistem enfeksiyonu olan hastalardan elde edilmiş 30 izolatın 11'inde (%36.7) GSBL saptanmış, bu izolatların yedisinde CTX-M-15, üçünde CTX-M-3 ve birinde ise CTX-M-1 belirlenmiştir. Bu konuda yapılan diğer bildirimlerde de idrar yolundan elde edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında CTX-M-1 grup ve bu grup içinde de CTX-M-15'in baskın olduğu gözlenmektedir[47,48]. Çalışmamızda değerlendirilen bakterilerin %73.7'sini (437/593) idrar izolatları (%87.2 *E. coli* ve %12.8 *Klebsiella* spp.) oluşturmaktadır. GSBL ürettiği belirlenen izolatların %66.5'i (112 *E. coli*, 20 *K. pneumoniae* ve bir *K. oxytoca*) de idrar örneklerinden elde edilmiştir. Bu izolatların %82.7'sinde CTX-M-15 bulunduğu belirlenmiştir. İdrar örneklerinden elde edilen ve GSBL ürettiği belirlenen *E. coli* izolatlarımızın %83'ünde CTX-M-15 enzimi bulunmaktadır. Çalışmamızda, GSBL üreten izolatlar daha fazla oranda (%57.9) yatan hastalardan izole edilmiş olmasına rağmen, bu enfeksiyonlarda kaynağın genellikle endojen olduğu düşünüldüğünde, karşılaşılan oranın toplumda CTX-M-15 enziminin sıklığı hakkında kısmen fikir verici olduğu gözlenmektedir. Çalışmamızda GSBL üreten izolatların, diğer izolatlara göre, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam, gentamisin, amikasin, tobramisin, trimetoprim-sülfometoksazol, nitrofurantoin ve yanı sıra siprofloksasin ve levofloksasine anlamlı olarak daha dirençli oldukları saptanmıştır.

Sonuç olarak, son birkaç yılda CTX-M üreten izolatların hastane ve toplum ortamında yaygın-

laştığı gözlenmektedir. CTX-M enzimini üreten *E. coli*'nin neden olduğu toplumdan edinilmiş üriner sistem enfeksiyonları önemli bir sorun niteliğindedir. İzolatlarımızda GSBL oranı yüksek olup, dominant enzim tipi CTX-M-15 olarak bulunmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma B.E.Ü. Bilimsel Araştırma Projelerini Destekleme Koordinatörlüğü tarafımdan (Proje No:2010-20-01-07) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum-β-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents Chemother* 2004; 48:1-14. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004
2. **Cantón R, Coque TM.** The CTX-M β-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:466-75. http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011
3. **Aktaş Z, Gönüllü N, Schneider I, Bal C, Bauernfeind A.** Hastanede yatan bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *Escherichia coli* suşunda CTX-M-15 tipi geniş-lemiş spektrumlu beta-laktamazın tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39:421-9.
4. **Gönüllü N, Aktaş Z, Bal Kayacan Ç, et al.** Dissemination of CTX-M-15 β-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *E. coli* in a university hospital in İstanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1110-2. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01974-07
5. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. In Europe. *Euro Surveill* 2008; 13:19044.
6. **Harada, S, Ishii Y, Yamaguchi K.** Extended-spectrum β-lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med* 2008; 28:401-12. http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2008.28.6.401
7. **Murray PR.** Manual of Clin Microbiol. Vol. 1, 8th ed. ASM Press, Washington, DC, 2003.
8. **Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A.** Extended-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Inf Dis* 1988; 10:867-78. http://dx.doi.org/10.1093/clinids/10.4.867
9. **CLSI.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, 7th ed. Document M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Instıtute, 2006.
10. **Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, de Champs C.** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in B´ejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:397-402. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.12.007
11. **Muzaheed YD, Adams-Haduch JM, Shivannavar CT, Paterson DL, Gaddad SM.** Faecal carriage of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with acute gastroenteritis. *Indian J Med Res* 2009; 129:599-602.
12. **Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ.** Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:154-5. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki412
13. **Kim J, Lim YM, Rheem I, et al.** CTX-M and SHV-12 β-lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 245:93-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.029
14. **Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R.** Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:500-10. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.2.500-510.2002
15. **Oteo J, Navarro C, Cercenado E, et al.** Spread of Escherichia coli strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2359-66. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00447-06
16. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al.** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:165-74. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl483
17. **Galas M, Decousser JW, Breton N, et al.** Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:786-89. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00906-07
18. **Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A.** European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2605-12. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00640-08
19. **Empel J, Baraniak A, Literacka E, et al.** Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer β-Lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2449-54. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00043-08
20. **Markovska R, Schneider I, Keuleyan E, et al.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist* 2008; 14:119-28. http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2008.0814
21. **Romero L, López L, Rodríguez-Ba-o J, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Pascual A.** Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2005;

11:625-31.
http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01194.x

22. **Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A, and the Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH).** Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-Lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2122-5.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.5.2122-2125.2005
23. **Machado E, Coque TM, Cantón R, et al.** High diversity of extended-spectrum β-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1370-4.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm381
24. **Valverde A, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, et al.** Spread of bla(CTX-M-14) is driven mainly by IncK Plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:5204-12.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01706-08
25. **Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L.** Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3724-32.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.12.3724-3732.2003
26. **Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, et al.** Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:157-62.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.013
27. **Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM.** Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:509-13.
28. **Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, et al.** A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992; 20:158-63.
http://dx.doi.org/10.1007/BF01704610
29. **Petroni A, Corso A, Melano R, et al.** Plasmidic extended-spectrum β-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1462-8.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.5.1462-1468.2002
30. **Radice M, Power P, Conza JD, Gutkind G.** Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 20; 602-4.
http://dx.doi.org/10.1128/aac.46.2.602-604.2002
31. **Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al, International Klebsiella Study Group.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3554-60.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.11.3554-3560.2003
32. **Lartigue MF, Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P.** First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:315-6.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg335
33. **Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P.** Diversity of genetic environment of bla(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234:201-7.
http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09534.x
34. **Açıkgöz ZC, Gülay Z, Biçmen M, Göçer S, Gamberzade S.** CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:503-5.
http://dx.doi.org/10.1080/00365540310013270
35. **Nazik H, Öngen B, Kuvat N.** Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among isolates obtained in a Turkish intensive care unit. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:310-2.
36. **Bahar G, Mert A, Catania MR, Koncan R, Benvenuti C, Mazzariol A.** A strain of Salmonella enterica serovar Virchow isolated in Turkey and carrying a CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase. *J Chemother* 2006; 18:307-10.
http://dx.doi.org/10.1179/joc.2006.18.3.307
37. **Öksüz L, Gürler N.** *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tiplendirilmesi ev plazmid profil analizi. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43:183-94.
38. **Açıkgöz ZC, Eser ÖK, Kocagöz S.** CTX-M-3 type beta-lactamase producing Shigella sonnei isolates from pediatric bacillary dysentery cases. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:135-7.
39. **Öktem İM, Gülay Z, Biçmen M, Gür D; HITIT Project Study Group.** qnrA prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:13-7.
40. **Aktaş Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A.** Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemother* 2008; 54:101-6.
http://dx.doi.org/10.1159/000118661
41. **Gür D, Gülay Z, Akan OA, ve ark.** Türkiye'de hastane izolatı Gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: Çok merkezli Hitit sürveyansının sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42:537-44.
42. **Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP.** Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:284-8.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn181
43. **Çelik DA, Yuluğkural Z, Kuloğlu F, et al.** CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from community acquired upper urinary tract infections at a university in the European part of Turkey. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43:163-7.
http://dx.doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60026-6
44. **Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, et al.** Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:523-6.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.017
45. **Metan G, Gülmez D, Eser ÖK, Kocagöz S, Sardan YÇ, Hasçelik G.** CTX-M-3-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Morganella morganii*: first

description of an isolate from Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:368-70.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.018

46. **Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Çağatay AA, Badur S, Nordmann P.** Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2950-54.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01672-07
47. **Tikveşli S, Cevahir N, Kaleli İ.** *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında CTX-M tipi beta-laktamazların fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43:553-62.
48. **Azap ÖK, Arslan H, Şerefhanoğlu K, et al.** Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:147-51.
http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02941.x

YAZARLARA BİLGİ

- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin yayın organı olup ilgili alanlardaki özgün araştırma, derleme, olgu sunumu, bilimsel haberler, bilimsel kitap ve dergi tanıtım yazıları ile okuyucu mektuplarını yayımlayan hakemli bir dergidir.
- Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık olmak üzere üç ayda bir çıkar ve dört sayıda bir cilt tamamlanır.
- Yazılar Türkçe olarak yollanmalıdır.
- Yazıların sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yayımlanması istenen metnin dayandığı çalışma, daha önce bir yerde yayımlanmamış ya da yayımlamak üzere teslim edilmiş veya kabul edilmiş olmamalıdır. Özet biçiminde yayımlanmış bir ön bildirinin bitmiş biçimine yer verilebilir.
- Dergiye gönderilen yazılar, ilk olarak dergi standartları açısından incelenir. Derginin istediği forma uymayan yazılar, daha ileri bir incelemeye gerek görülmeksizin yazarlarına iade edilir. Bu nedenle gereksiz yere zaman ve emek kaybına yol açılmaması için, yazı sahipleri dergi kurallarını dikkatli incelemek zorundadır.
- Dergi kurallarına uygunluğuna karar verilen yazılar konu ile ilgili kişilerden en az iki hakeme gönderilir ve hakemlerden yayına uygun olup olmadığı konusunda görüşleri alınır. Düzeltme isteniyorsa tekrar yazara gönderilir ve düzeltmelerin bir ay içinde yapılması gerekir. 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 yapılana kadar, söz konusu yazılar yayın programına alınmayacaktır.
- Teslim edilmiş bir metnin tümünün veya bir bölümünün bir başka yerde yayımlanması söz konusu olursa editörlere bilgi verilmesi zorunludur.
- Yayımlanması kabul edilmeyen metinler geri verilmez.

Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Tüm yazılar .doc formatında word dosyası şeklinde **tmcdeditor@gmail.com** adresine yollanmalıdır.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve telif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak ve 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 ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.

Prof. Dr. Çağrı Ergin

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası
Kınıklı / Denizli
Tel: 0 (258) 296 24 91
E-posta: tmcdeditor@gmail.com

Metin Çeşitleri

- Özgün Araştırma: En çok 15 sayfa; gerekli ve uygun sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 250 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; Türkçe ve İngilizce en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Derleme: En çok 20 sayfa; 1-4 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 200 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Mini Derleme: En çok 10 sayfa; 1-4 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 50 kaynak; 200 sözcük içeren Türkçe ve İngilizce özetler; en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Olgu Sunum: En çok 5 sayfa; yeterli sayıda şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik; en çok 50 kaynak; 200 sözcüğü geçmeyen İngilizce-Türkçe özet; en az 3 anahtar sözcük ve ana metinden oluşmalıdır.
- Editöre Mektup: Daha önce yayımlanmış olan bir yazı hakkında olabilir. Yeni bir araştırmaya ait bulguların bildirilmesi durumunda ise en çok 2 sayfa, çok gerekli durumlarda 1 şekil/tablo/fotoğraf/resim/grafik ve en çok 5 kaynak içerebilir.

Metin Bölümleri

1. Başlık Sayfası

- Yazının kısa, açık ve içeriği tam yansıtır Türkçe başlığı
- Türkçe başlık ile birebir uyuşan İngilizce başlık
- Yazarların adları
- Yazarların çalıştığı merkezler
- İletişimden sorumlu yazarın; adı, adresi, telefon-faks numarası ve e-posta adresi
- Araştırma daha önce bir bilimsel toplantıda bildiri (sözlü veya poster) olarak sunulmuş ise, bu bilgi toplantının adı ve tarihiyle birlikte belirtilmelidir.

2. Özet Sayfası

- Türkçe ve İngilizce özetler başlık sayfasından sonraki sayfada yer almalıdır ve bire bir uyumlu olmalıdır.
- Özetler yazının türüne uygun sayıda sözcük içermelidir.
- Türkçe özetin arkasından Türkçe anahtar sözcükler (en az 3 sözcük), İngilizce özetin ardından İngilizce anahtar sözcükler (en az 3 sözcük) gelmelidir.
- Özgün araştırma metinlerinde hem Türkçe hem de İngilizce özetler bölünmüş olmalıdır. Amaç, gereç ve yöntem, bulgular ve sonuç bölümlerine ayrılmalıdır.
- Olgu sunumu, derleme, editöre mektup gibi diğer metin çeşitlerinde bölümlü özet hazırlamaya gerek yoktur.
- Özet bölümünde kısaltmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalı ve kaynak, şekil, tablo ve atıf yer almamalıdır.

3. Ana Metin Sayfaları

- 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 adlan 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.
- *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.

4. Teşekkür ve Diğer Vurgular

- Bir teşekkür yazısı varsa Kaynaklar'dan önce olmalıdır.
- Çalışma kazanılmış bir burs veya proje ile tamamlanmışsa belirtilmelidir.

5. Kaynaklar

- 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 Arap rakamları ile yazılmalıdır. Örneğin; ..... gösterilmiştir (1,5,6).
- Metinde kaynak verilirken yazar adı kullanılıyorsa kaynak numarası yazar adının yanına yazılmalıdır. Örneğin; Smith ve Gordon'a (4) göre .....
- Henüz yayınlanmamış veriler ve çalışmalar kaynaklar bölümünde yer almamalıdır.
- Dergimiz, başka çalışmalarda bildirilen kaynakların aktarma şeklinde kullanılmasını kabul etmemektedir. Bir kaynağın aslından yararlanılmamış olduğu düşünüldüğünde, yazarından söz konusu kaynak ya da kaynakların ilk sayfalarının fotokopilerini göndermesi istenir. Yazarlar tarafından doğrulanmayan kaynaklar dizgi aşamasında yazıdan ayıklanacaktır.
- 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 (www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html). Index Medicus'ta bulunmayan dergi adları kısaltılmadan yazılmalıdır.
- Dergide kaynaklar yazılırken aşağıdaki örnekler esas alınmalı; noktalamalar, kelime ve harf aralıkları, büyük harfler, dergi ve cilt numarası buna göre düzenlenmelidir.

Örnekler

A. Makaleler

- Standart Dergi Makalesi: Davies J, Courvalin P. Mechanisms of resistance. *Amer J Med* 1977; 62:868-72.
- Dergi Ekinde (Supplement) yer alan makale: Frumin AM, Jennings H. Functional asplenia. *J Infec Dis* 1992; 165 (Suppl 1):S156-8.
- Yazarı verilmemiş makale: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J* 1981; 283:628.
- Elektronik formatta makale: Mansur T, Artunkal S. *Fusarium oxysporum* infection of stasis ulser: eradication with measures aimed to improve stasis. *Mycosis* 2009 (DOI: 10.1111/j.1439 0507.2009.01800.x)

B. Kitaplar

- Kitap: Pelczar MJ, Chan ACS, Krieg S. Microbiology. 5th ed. New York: McGrew Hill Co, 2003. Bir kuruluş tarafından yayımlanmış olan kitaplarda basımevinin değil, yayımlanan kuruluşun adı ve varsa yayın numarası kullanılmalıdır. Örneğin "İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi Yayın No 20, 1956." gibi.
- Kitap Bölüm: Cade AR. Gump WS. The bisphenols. In: Reddish GF, Davies J, eds. Antiseptics, Disinfectants and Fungicides. 2nd ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1957: 1657-9.
- Kongre Konuşma, Bildiri Özeti: Seyer A, Yaman M. Çeşitli besiyerlerinde *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. XI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, 21-25 Ekim 2008, Antalya: Türkiye. Sayfa 509.
- Tez: Küçüker M. Mikoplazmalar [doktora]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 1986.

C. Sanal Ortam

- Web sitesi: World Health Organization. Global strategy. Geneva: World Health Organization. 2001 [http://www.who.intemational].

6. Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler ana metin içine yerleştirilmiş halde gönderilmemelidir. Tablolar, kaynaklardan sonra her sayfada bir tablo olacak şekilde yazının gönderildiği dosya içinde olmalıdır. Diğer dökümanlar ise ayrı dosyalar halinde gönderilmelidir.
- 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 metinle beraber en sona eklenerek yollanmalıdır.
- Şekillerde ölçü önemli ise üzerine cm veya mm'yi gösteren bir ölçek çizgisi konmalıdır.
- Fotoğraflar tanınmayı engelleyecek şekilde olmalı ve hastalardan yazılı onam alınmalıdır.
- İsim, baş harfler, hastane kayıt numarası gibi kimlik bilgileri yazılmamalıdır.
- Renkli resim için yazarlardan ayrıca ücret talep edilir.
- Tablo, şekil, fotoğraf, resim ve grafikler gibi dökümanlar başka bir yayından alıntı ise yazılı baskı izni mutlaka gönderilmelidir.