Cilt / *Volume* 47
Sayı / *Number* 3
Eylül / *September* 2017

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

✔ Zika Virüs: Güncel Durum, Koruyucu Aşı Çalışmaları ve Antiviral Tedavi Seçenekleri

✔ Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinden Elde Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Çeşitli Virülans Faktörlerine Kurkuminin Etkisi

✔ *Candida* Cinsi Mayaların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Analizi

✔ Kan Kültürlerinden Izole Edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* Suşlarının In-Vitro Daptomisin ve Linezolid Duyarlılık Profilleri

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 47

Sayı / *Number* 3

Eylül / *September* 2017

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 47 Sayı / *Number* 3 Eylül / *September* 2017

Editör / *Editor in Chief*

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

Bölüm Editörleri / *Section Editors*

Sebahat Aksaray; Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Nilay Çöplü; Kastamonu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Ayşe Esra Karakoç; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Ebru Evren; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bedia Dinç; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Ramazan Gümral; Van Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Funda Doğruman-Al; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar Kurulu / *Advisory Board*

Gülay Aral Akarsu, Ankara
Orhan Cem Aktepe, İzmir
Özlem Kurt Azap, Ankara
Betil Özhak Baysan, Antalya
Pınar Çıralıgil, Adana
Hande Dağcı, İzmir
Gülfem Ece, İzmir
Hatice Ertabaklar, Aydın
Duygu Fındık, Konya
Jülide Sedef Göçmen, Ankara
Zeynep Gülay, İzmir
Dolunay Gülmez, Ankara
Ayşe Nedret Koç, Kayseri
Gülay Korukluoğlu, Ankara
İpek Mumcuoğlu, Ankara
Tuncer Özekinci, Diyarbakır
Mehmet Ali Öktem, İzmir
Yasemin Öz, Eskişehir
Tuncer Özekinci, Diyarbakır
Ayşegül Özkan, Çorum
Mustafa Özyurt, İstanbul
Ayça Arzu Sayıner, İzmir
Ayşin Zeytinoğlu, İzmir

Yayımlanan sayıya ait değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

"TÜBİTAK ULAKBİM Tıp Veri Tabanı" ve "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* 47 Sayı / *Number* 3 Eylül / *September* 2017

İÇİNDEKİLER / *CONTENTS*

DERLEME / *REVIEW*

- **Zika Virus: Güncel Durum, Koruyucu Aşı Çalışmaları ve Antiviral Tedavi Seçenekleri**
  Zika Virus: Current Status, Protective Vaccination Studies, and Antiviral Treatment Alternative
  Fatih ŞAHİNER, Kemal TEKİN, Ramazan GÜMRAL **97-105**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / *CLINICAL INVESTIGATIONS*

- **Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinden Elde Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Çeşitli Virülans Faktörlerine Kurkuminin Etkisi**
  The Effect of Curcumin on Several Virulance Factors of Pseudomonas aeruginosa Isolates Obtained From Respiratory Tract Samples of Cystic Fibrosis Patients
  Reyhan MUTLU, Aynur EREN TOPKAYA **106-113**

- ***Candida* Cinsi Mayaların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Analizi**
  Comparative Analysis of Different Methods Used for the Identification of Candida on Species Level
  Hatice ERDEM, Sidre ERGANİŞ, Ebru EVREN, Fatma Nur AKSAKAL, Kayhan ÇAĞLAR, Ayşe KALKANCI **114-124**

- **Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* Suşlarının In-Vitro Daptomisin ve Linezolid Duyarlılık Profilleri**
  In Vitro Daptomycin and Linezolid Susceptibility Profiles of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis Strains Isolated from Blood Cultures
  Duygu Nilüfer ÖCAL, Oğuz Alp GÜRBÜZ, Zeynep DANSUK, Esra AKKAN KUZUCU, Enes ALTUNAY, Nalan APAYDIN, Gül ERDEM **125-130**

- **Menenjit Etkenlerinin Real-time PCR Yöntemiyle Araştırılması**
  Investigation of the Causative Agents of Meningitis By Real-Time PCR Method
  Oya AKKAYA, Hülya İren GÜVENÇ, Asuman GÜZELANT, Meral KAYA,
  Şerife YÜKSEKKAYA, Ayşegül OPUŞ, Muhammet Güzel KURTOĞLU,
  Habibe ÖVET **131-137**

- **Boğaz Sürüntü Örneklerinden A Grubu Beta-Hemlitik Streptokokların Belirlenmesinde Bionexia Strep A Plus Hızlı Antijen Testinin Kullanımı**
  Use of Bionexia Strep A Plus Rapid Antigen Test in the Identification of Group A Beta-Hemolytic Streptococci in Throat Swab Samples
  Nurcan SAYĞILI, Emin BULUT, Rıdvan DENİZ, Nazan DALGIÇ, Elif AKTAŞ **138-145**

OLGU SUNUMU / *CASE REPORT*

- **Seyrek İzole Edilen Bir Etken: *Listeria monocytogenes***
  A Rarely Isolated Pathogen: Listeria monocytogenes
  Zeynep AYAYDIN, Gülseren SAMANCI AKTAR, Arzu RAHMANALI ONUR,
  Demet GÜR VURAL, Hakan TEMİZ **146-150**

YAZARLARA BİLGİ ..... **V-VI**

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):97-105, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.097

Derleme

Zika Virus: Güncel Durum, Koruyucu Aşı Çalışmaları ve Antiviral Tedavi Seçenekleri

Fatih ŞAHİNER*, Kemal TEKİN, Ramazan GÜMRAL*****

**Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara*

***Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara*

****Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van*

ÖZ

Zika virusun keşfedilmesinden (1947, Uganda) bu yana yaklaşık olarak 70 yıl geçti, fakat son 10 yıla kadar bu virusun patogenezi ve klinik seyri hakkında çok az bilgi vardı. Bununla beraber, son yıllarda virusun klinik ve epidemiyolojik paterninde önemli değişiklikler meydana geldi. İlk olarak Zika virusun Guillain-Barré sendromu (GBS) gibi nörolojik hastalıklarla ilişkili olabileceği öne sürüldü. Daha sonra konjenital Zika virus enfeksiyonlarının mikrosefali ve diğer bazı nörogelişimsel hastalıklarla ilişkili olabileceği öne sürüldü. Bu yeni durum, başlangıçta kuşkuyla karşılansa da deneysel çalışmaların ortaya koyduğu sonuçlar ve bildirimi yapılan olguların artmasıyla Zika virus enfeksiyonlarının GBS, mikrosefali ve çeşitli nörogelişimsel ve oftalmolojik bozukluklarla ilişkili olduğunu gösteren yeni kanıtlara ulaşıldı. Etkilenen kişi sayısının son iki yılda milyonlara ulaşması ve Zika virus enfeksiyonlarının ciddi klinik tablolarla ilişkilendirilmesi küresel boyutta endişelere yol açtı. Bu gelişmelerin bir sonucu olarak, bir taraftan çeşitli koruyucu önlemler tartışılırken, diğer yandan yeni tedavi seçenekleri ve yeni aşılar üzerine yürütülen çalışmalar devam etmektedir. Aynı dönemde, Zika virus enfeksiyonlarının patogenezini açıklamaya yönelik birçok çalışma yapıldı. Bu derlemede Zika virus salgınlarının güncel durumu ve başta koruyucu aşı çalışmaları olmak üzere yeni antiviral tedavi seçenekleri ve viral patogeneze dair bilgilerin bir özeti sunulmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Antiviral tedavi, aşı, patogenez, Zika virus*

ABSTRACT

Zika Virus: Current Status, Protective Vaccination Studies, and Antiviral Treatment Alternatives

Since the discovery of the Zika virus in 1947 in Uganda, 70 years have passed, but until the past 10 years, there was little information about the pathogenesis and clinical course of the Zika virus infection. However, in recent years, important changes have occurred in the clinical and epidemiological pattern of the virus. FirstIy it was suggested that the Zika virus might be associated with some neurological disorders, such as Guillain-Barré syndrome (GBS). Then it was suggested that congenital Zika virus infections might be associated with microcephaly and other neurodevelopmental disorders. This new view was initially met with skepticism, but it has been supported by new evidence that strengthens the association between Zika virus infections and GBS, microcephaly, and various neurodevelopmental and ophthalmologic disorders, thanks to the increasing number of case reports and the results of experimental studies. The number of affected people has reached to the millions within the past two years, and the association between Zika virus infections and serious clinical manifestations has caused global concern. As a result of these developments, studies on new treatment alternatives and new vaccine trials is continuing, in addition to discussion of various protective measures. Meanwhile, many studies were conducted to explain the pathogenesis of Zika virus infections. In this review, we present a summary of the current status of Zika virus outbreaks and information on new antiviral treatment options, predominantly protective vaccine trials, and viral pathogenesis.

Keywords: *Antiviral treatment, vaccine, pathogenesis, Zika virus*

GİRİŞ

İnsanlarda enfeksiyon neden olduğu ilk olarak 1952 yılında gösterilen bu virusun genel anlamda hafif seyirli enfeksiyonlara neden olduğu ve Asya ve Afrika arasındaki dar bir Ekvatoral hat

Alındığı tarih: 23.03.2017
Kabul tarihi: 02.05.2017
Yazışma adresi: Ramazan Gümral, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İskele Binası Altıntepe Mah. İskele Cad. No:10, Tuşba / Van
Tel: +90 (432) 222 00 07
e-posta: rgumral@gmail.com

boyunca sınırlı olduğu düşünülmekteydi[1,2]. İlk Zika virus salgını 2007 yılında Yap Adası'nda (Mikronezya) ortaya çıktı ve bu salgında Zika virus enfeksiyonu ile uyumlu semptomlara sahip 185 olgu (108'i laboratuvar olarak doğrulanmış) bildirildi. Bu salgından önceki dönemde ise yaklaşık 50 yıllık bir süreçte çok az sayıda insan olgusu bildirilmişti[3,4]. 2013 yılında Fransız Polinezyası (FP)'nda ortaya çıkan ve yaklaşık 32.000 kişinin etkilendiği tahmin edilen salgında Zika virusun Guillain-Barré sendromu (GBS) da dâhil olmak üzere bazı otoimmün ve nörolojik hastalıklar ile ilişkili olabileceği öne sürüldü[5]. 2014 yılında virus Pasifik adaları (Cook adası, Yeni Kaledonya, Paskalya adası) boyunca Güney Amerika kıtasına doğru yayılırken, sivrisinek dışı bulaşma yolları tartışıldı (örneğin, cinsel temas, vücut sıvıları, kan transfüzyonu) ve bunlarla ilgili veriler ortaya kondu[4,6]. 2015 yılına gelindiğinde virus kıtasal Amerika'ya ulaştı ve enfeksiyondan etkilenen kişilerin sayısı kısa bir süre içerisinde milyonlara ulaştı[7]. Brezilya salgınında (2015) ilk kez Zika virusun neden olduğu konjenital enfeksiyonların bazı nörogelişimsel ve oküler hastalıklarla ilişkili olabileceği öne sürüldü[8,9]. Bu bildirimlerden sonra Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Şubat 2016'da Zika virus salgınını ciddi bir halk sağlığı sorunu ve uluslararası acil durum olarak ilan etti[10]. Bu durum uluslararası sağlık örgütleri, ticari enstitüler ve bağımsız araştırmacıların Zika virus enfeksiyonlarının patogenezi, koruyucu aşı geliştirme ve tedavi seçenekleri üzerine yoğun çabalar ve araştırmalar yapmalarına öncülük etti. Bu derleme, literatürde sunulan çalışmaların bir özetini içermektedir.

Viral yapı

Zika virus, Flaviviridae familyası Flavivirus cinsinin bir üyesidir ve adını Uganda'da bulunan Zika Ormanı'ndan almıştır[11,12]. Genetik araştırmalara göre, Zika virusun Afrika ve Asya kökeni (lineage) olmak üzere iki ana genotipi vardır[4]. İki köken arasında >%95 amino asit özdeşliği bulunmaktadır[13]. Kıtasal Amerika'daki salgının Asya kökenli suştan kaynaklandığı gösterilmiştir[7,14]. Bazı araştırmacılar, Afrika kökenini Batı Afrika (Senegal-Nijerya) ve Doğu Afrika (Uganda) alt tiplerine ayırmaktadır[15]. Moleküler analizler Zika virusun genetik olarak Spondweni, Kedougou ve Bagaza viruslarıyla yakın benzerliği olduğunu ortaya koymuştur[16]. Zika virus genomu yaklaşık 11 kb (10.794 nükleotid) uzunluğunda, tek zincirli, pozitif polariteli RNA'dan oluşur ve 3.419 aminoasit kodlar[17]. İkozahedral kapsitli ve zarflı bir virus olan Zika virusun replikasyonu diğer flaviviruslara benzerlik gösterir[6]. İlk olarak viral zarf (E) glikoproteini virusa özgü hücre reseptörlerine (insanda; DC-SIGN, Tyro3, AXL ve daha az olarak TIM-1) tutunur ve endozomlar aracılığı ile hücre içerisine alınır[18,19]. Zarf ve endozomal membranların füzyonu sonucu viral soyunma (uncoating) gerçekleşir. Pozitif iplikli enfeksiyöz RNA'dan ilk olarak bir poliprotein sentezlenir ve daha sonra bu protein viral proteaz ile (NS2B-NS3) kesilerek yapısal ve yapısal olmayan proteinlere ayrılır. Sitoplazmada gerçekleşen virus replikasyonunu; endoplazmik retikulumda toplanma ve sonrasında tomurcuklanma basamakları takip eder[6,19]. Virus son olarak ekzositoz ile hücreden ayrılır. Viral genom, üç yapısal [zarf (E), premembran/membran (PrM), kapsid (C)] ve yedi yapısal olmayan (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) proteini kodlamaktadır[6,20]. Zika virus potasyum permanganat, eter ve >60°C sıcaklıkta inaktive olurken, %10 etanol ile etkili bir şekilde nötralize edilemez[1].

Patogenez

Zika virus enfeksiyonlarının patogenezine dair bilgiler kısıtlı olmakla beraber, yeni yapılan araştırmalar ile bu konuda önemli verilere ulaşılmıştır. Geçmişte ayrıntılı olarak çalışılan diğer flavivirus enfeksiyonlarına dair bilgiler de viral patogenezin anlaşılmasına ışık tutmaktadır.

Diğer sivrisinek kaynaklı flaviviruslarda gözlemlendiği gibi, Zika virusun da ilk olarak inokülasyon yerine yakın dentritik hücrelerde replike olduğu ve daha sonda bölgesel lenf nodlarına ulaşarak kan dolaşımına geçtiği düşünülmektedir[17]. 2015 tarihli yeni bir çalışmada, insan dermal fibroblastları, epidermal keratinositler ve olgunlaşmamış dendritik hücrelerin; çoğu Zika virus izolatına karşı duyarlı olduğu ve enfeksiyon gelişimine izin verdiği gösterilmiştir[18]. Aynı çalışmada, Zika virusun Toll-like reseptör 3 (TLR3), RIG-I ve MDA5'in transkripsiyonunu indüklediği, beta interferon gen ekspresyonunu kuvvetli bir şekilde arttıran bazı genleri stimüle ettiği ve hem tip I hem de tip II interferonların antiviral etkilerine duyarlı olduğu gösterilmiştir.

Zika virusa atfedilen mikrosefali, GBS ve ensefalomiyelit gibi ciddi enfeksiyon tablolarının virusun nörönal sisteme tropizm göstermesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir[21-23]. Zika virusun keşfinden birkaç yıl sonra (1952) yapılan bir çalışmada, virusun nörotropik karakteristiğine dair ilk veriler elde edilmiştir[1]. Söz edilen çalışmada, intraperitoneal olarak enfekte edilen farelerin beyinlerinde viral enfeksiyon geliştiği gösterilmiştir. Bu çalışma, virusun kan beyin bariyerini geçebildiğini gösteren ilk verileri içermesi nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir. Yaklaşık 20 yıl sonra (1971) yapılan ve deneysel fare modeli üzerine kurgulanmış olan farklı bir çalışmada intraserebellar olarak virus inoküle edilen yenidoğan ve beş haftalık farelerin beyin dokusu incelemelerinde, astrositlerde genişleme ve hipokampusta piriform hücrelerde destrüksiyon geliştiği saptanmıştır[24]. Bununla beraber, yakın zamana kadar Zika virusun insanlarda nöroinvaziv enfeksiyonlara yol açtığına dair bir veri bulunmamaktaydı. Ancak, Zika virus ile yakın ilişkili olan Japon Ensefalit Virusu (JEV)'nun ve Zika virus ile aynı genusta yer alan Batı Nil Virusu (BNV)'nun ensefalit ve menenjit gibi invaziv nörolojik sistem bozukluklarına yol açmaları, Zika virusun da nörolojik sistemi etkileyen enfeksiyon tablolarına yol açabileceğini düşündürmekteydi[16,17]. Sonuç olarak, yakın zamanda yapılan deneysel çalışmalar ve olgu bildirimleri ile Zika virusun nörolojik sistem üzerine olan etkileri aydınlatılmaya başlamıştır. Deneysel çalışmalarla Zika virusun farelerde plasenta aracıyla fetüse geçtiği ve nöral gelişimi hasara uğratarak mikrosefali oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir[25,26]. İn-vitro olarak yürütülen diğer çalışmalarda ise Zika virus enfeksiyonlarının insan nörosferleri ve beyin organoidlerinde büyümeyi engellediği ve insan kortikal progenitör hücrelerini hedefleyerek apopitoz ve otofaji ile hücre ölümünde artışa yol açarak nörogelişimin bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir[26,27].

Zika virus enfeksiyonlarının ciddi patolojik sonuçlarından bir diğeri de oftalmolojik tutulma bağlı olarak ortaya çıkan hastalık tablolarıdır[28,29]. Zika virusun nöral kök hücreleri içerisine girerken kullandığı majör reseptör olan AXL reseptörlerinin insan radiyal glial hücrelerde, astrositlerde, endotelyal hücrelerde, gelişmekte olan insan korteksi mikroglia hücrelerinde ve gelişmekte olan retinal progenitör hücrelerde daha yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiş olup, bu bilgi virusun nörogelişimsel ve retinal patolojilerle ilişkisini bir dereceye kadar açıklamaktadır[19]. Zika virusun oftalmolojik manifestasyonlar ile ilişkisi tartışılmaya başlamadan önce yakın ilişkili diğer bir virus olan BNV'un insanlarda retinal lezyonlara neden olduğu bilinmekteydi[30]. Diğer flaviviruslarda olduğu gibi, Zika virusun da göze iki ayrı yolla ulaştığı düşünülmektedir. Bunlardan birinin ilk olarak beyin invazyonu ve daha sonra retrograd transport ile optik sinir aracılığıyla göze ulaşma ve ikincisinin de hematojen yolla kan beyin bariyerini geçerek doğrudan göze ulaşma şeklinde olabileceği düşünülmektedir[31]. Zika virusun deneysel hayvan modeli çalışmalarında üveiti indüklediği ve insanlarda üveite neden olduğu da gösterilmiştir[31,32]. Bu çalışmalardan birinde,

deneysel olarak enfekte edilen farelerde Zika virus ilişkili konjunktivit, pan-üveit, "kornea, iris, optik sinir ve retinanın hücresel kompartmanlarında" enfeksiyon geliştiği gösterilmiştir[31].

Epidemiyoloji

Günümüze kadar yapılan çalışmalar Zika virusun Afrika, Asya, Pasifik adaları, Güney ve Orta Amerika ülkeleri ve yakın zamanda Kuzey Amerika'ya kadar geniş bir coğrafi alana yayıldığını göstermektedir[6,33,34]. Zika virus, keşfedildiğinden sonraki 60 yıl boyunca Afrika ve Asya dışındaki bölgelerde belirlenmemişti. Virus 2007'de Pasifik adalarına yayılarak ilk büyük salgınına yol açmıştır. Zika virus 2013'te FP, 2015'te Güney Amerika ve 2016 yılında ise Orta ve Kuzey Amerika'ya yayıldı[6]. DSÖ ve CDC (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri, Centers for Disease Control and Prevention) tarafından yayımlanan son raporlara göre virus hâlen aktif olarak yeni bölgelere yayılmaya devam etmekte olup, günümüzde ağırlıklı olarak Güney ve Orta Amerika ülkeleri olmak üzere 70'in üzerinde ülke veya bölgeye yayılmış durumdadır[33,34]. Bu epidemiyolojik değişim duyarlı bireylerden oluşan büyük popülasyonların etkilenmesi ile sonuçlanmıştır. Diğer taraftan Avrupa ve Uzakdoğu ülkeleri de dâhil olmak üzere farklı ülkelerden çok sayıda import olgu bildirimleri de devam etmektedir[6]. Çok sayıda import olgu bildiriminin yapıldığı Avrupa-Akdeniz havzasının iklim koşulları ve vektör sivrisineklerin varlığı nedeniyle gelecekteki olası salgınlar için risk altında olduğu değerlendirilmektedir[35].

Bulaş ve Korunma

Virusun bulaşı başlıca sivrisinek vektörler (*Culicidae* ailesi *Aedes* cinsi) tarafından ısırılma ile olmaktadır[4]. Diğer bir yaygın bulaş yolu olarak anneden bebeğe geçiş (intrauterin yol ve perinatal bulaş) öne sürülmüştür[36,37]. Brezilya'da yapılan bir çalışmada hamilelik döneminde enfeksiyon geçiren bazı kadınların amniyotik sıvı örneklerinde ve abortik fetüslerin beyin dokusu örneklerinde viral RNA varlığı gösterilmiştir[9,29,36]. Cinsel temas, kan transfüzyonu, anne sütü ve diğer vücut sıvıları (tükürük, idrar, semen, gözyaşı) ile temas olası bulaş yolları olarak öne sürülmüştür[37-39]. Yeni yayımlanan bir olgu sunumunda enfekte bir hastanın bakımını yapan bir kişiye doğrudan temasla Zika virus enfeksiyonu bulaştığını gösteren verilere ulaşılmıştır[40]. Zoonotik bir enfeksiyon olan Zika virusun diğer bir bulaş yolu da maymunlar veya diğer insan dışı primatlar tarafından ısırılma olarak öne sürülmüştür[41].

Zika virus enfeksiyonlarının lokal olarak yayıldığı bölgelere yolculuk yapan ve henüz enfekte olmamış tüm bireyler (hamile kadınlarda dâhil olmak üzere) enfeksiyon riski altındadır. Enfeksiyondan korunmada temel yol; sivrisinek ısırmasından kişisel korunma-kaçınma ve sivrisineklerin eradikasyonundan ibarettir[4]. CDC ve DSÖ tarafından yayımlanan rehberlerde hamile kadınların bu bölgelere yapacakları yolculukları ertelemeleri de dâhil olmak üzere çeşitli öneriler yer almaktadır[42].

Klinik

Klasik Zika virus enfeksiyonları genellikle asemptomatik veya subklinik seyirlidir[12]. Ancak bazen diğer arboviral enfeksiyonlara benzer klinik semptomlar görülebilmektedir. Semptomatik hastalık yaklaşık olarak hastaların %20'sinde ortaya çıkmaktadır[43]. Semptomlar genellikle hafif ve orta derecelidir; akut başlangıçlı ateş, makülopapüler döküntü, eklem ağrısı ve konjunktivit sık görülen semptomlardır ve tipik olarak 4-7 gün içerisinde düzelmektedirler[4,43]. Diğer semptomlar ekstremitelerde ödem, retroorbital ağrı, yorgunluk, baş ağrısı, çeşitli sindirimsel sorunlar, mukoza ülserasyonları ve kaşıntı şeklindedir[4,16].

Son 10 yıl içerisinde Zika virusun klinik ve epidemiyolojik paterninde önemli değişiklikler olmuştur. İlk olarak 2013 yılında FP salgınında otoimmün ve nörolojik hastalıkların insidansında belirgin bir artış olduğu gözlemlenmiştir[5]. FP salgınında otoimmün veya nörolojik hastalık belirlenen 74 kişide Zika virus ile uyumlu semptomların varlığı bildirilmiş ve bunların kırkikisinde GBS varlığı gösterilmiştir[10]. Bu oran GBS görülme sıklığında 20 katlık bir artışa denk gelmektedir[5]. 2013 yılı Kasım ayında laboratuvar olarak doğrulanmış Zika virus enfeksiyonu olan bir kadında GBS geliştiği detaylı olarak tanımlanmıştır[5]. Bunların dışında Şubat 2015'te DSÖ tarafından bir rapor yayımlanmış ve bu raporda GBS görülme olasılığının salgının aktif olduğu Brezilya'nın bazı bölgelerinde 5-6 kat arttığı bildirilmiştir[21]. DSÖ'nün Kasım 2016'da yayımlanan daha yeni bir raporuna göre ise en az 19 ülkeden konfirme edilmiş Zika virus enfeksiyonu ile birlikte olan GBS insidans artışı bildirilmiştir[33]. Diğer bazı viral enfeksiyonlardan sonra da GBS gelişebildiği için Zika virus ve GBS arasındaki ilişki sürpriz bir durum olarak görülmemiştir. Zika virusa atfedilen diğer bir hastalık grubu ise konjenital enfeksiyonları takiben meydana gelen mikrosefali ve çeşitli nörogelişimsel defektler olup, bu olası ilişki dünya çapında endişeye neden olmuştur[9,22]. Zika virus ve nörogelişimsel defektler arasındaki olası ilişkiye dair ilk bildirimler Brezilya'dan gelmiş ve salgın sırasında mikrosefali insidansının yaklaşık 20 kat arttığı belirlenmiştir[2,9]. Ciddi bir endişeye yol açan Brezilya'daki bu uyarıdan kısa bir süre sonra FP'daki olgular retrospektif olarak incelenmiş ve salgın döneminde 17 mikrosefali olgusunun görüldüğü saptanmıştır[8]. Bu sayı yıllık ortalama 0-2 olgunun bildirildiği bölge verilerinin çok üzerinde idi. DSÖ'nün Kasım 2016 tarihli raporunda 28 farklı ülke veya bölgede Zika virus ile olası ilişkili olduğu düşünülen nörogelişimsel malformasyon görülme sıklığında artış olduğu bildirilmiştir[33]. Bahsedilen raporda toplam 2352 mikrosefali veya santral sinir sistemi malformasyonu olgusu bildirilmiş olup, en fazla bildirim yapılan ülkeler Brezilya (2159 olgu), Kolombiya (58 olgu) ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD, 31 olgu) olmuştur. Mikrosefali dışında Zika virusa atfedilen diğer bulgular arasında intrakraniyal kalsifikasyonlar, ventrikülomegali, nöronal migrasyon bozuklukları, lizensefali, pakigiri, ciddi kortikal malformasyonlar ve serebellar hipoplazi yer almaktadır[8,9,22]. Yeni yayımlanan bir makalede, 19 yaşında bir kadında Zika virus enfeksiyonunu takiben tedrici başlangıç gösteren tetrapleji, üriner retansiyon ve azalmış bilinç düzeyi ile seyreden akut dissemine ensefalomiyelit tablosu bildirilmiştir[23]. Bu olgu bildirimi Zika virusun erişkinlerde de ciddi nörolojik hastalık tablolarına yol açabildiğini ortaya koyması bakımından önem taşımaktadır.

Zika virus enfeksiyonları ile ilişkili olduğu öne sürülen diğer bir hastalık grubu da çeşitli göz hastalıkları ve oftalmolojik anormalliklerdir[28,29]. Zika virus enfeksiyonlarında sık karşılaşılan göz bulgularından biri konjunktivittir. Yap Adası ve FP salgınlarında semptomatik hastaların %55-63'ünde konjunktivit görüldüğü bildirilmiş olmakla beraber, Brezilya'da yapılan 2015 tarihli bir çalışmada gebelikleri süresince Zika virus enfeksiyonu ile uyumlu semptomlar gösteren 23 kadının hiçbirisinde konjunktivit görülmemiştir[12,28]. Bu nedenle araştırmacılar Zika virus ile enfekte hastaların yalnızca %10-15'inde konjunktivit geliştiğini ve bu nedenle konjunktivitin ayırıcı tanıda önemi olmadığı sonucuna varmışlardır[31]. Konjenital Zika virus enfeksiyonlarında bildirilen oküler anormallikler; fokal pigment birikimleri, koryoretinal atrofi, optik sinir anormallikleri, iris kolobomu, lens subluksasyonu, maküler pigment birikimi, foveal refleks kaybı, makula atrofisi, bilateral hipersensitif iridosiklit, üveit ve mikroftalmidir[9,28,29,32,44,45].

Tanı

Zika virus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı klinik olarak uyumlu semptomları olan hastalarda; virusa spesifik IgM ve IgG antikorlarının hasta serumu veya beyin omurilik sıvısında gösterilmesi, doğrulayıcı tanı için plak nötralizasyon testi, doku örneklerinde immünhistokimyasal yöntemlerle viral antijenlerin saptanması, serum ve diğer vücut sıvıları ile plasental ve fetal doku örneklerinde viral RNA'nın gösterilmesi ile konulabilmektedir[4,11,12,16,39]. Bunların dışında tanısal doğrulama veya araştırma amacı ile virusun hücre kültürlerinde üretilmesi ya da moleküler yöntemlerle genotipleme ve sekans analizi gibi ileri düzey analizler de yapılmaktadır[6,7,38].

Tedavi

Zika virus enfeksiyonlarının tedavisi veya önlenmesi için onaylanmış herhangi bir aşı veya tedavi yöntemi henüz bulunmamaktadır. Şüpheli Zika virus enfeksiyonlarından sonra genel olarak sıtma ve dengue gibi daha ciddi enfeksiyon tabloları ekarte edildikten sonra semptomatik tedavi önerilmektedir[42,43]. Semptomatik tedavi sıklıkla dinlenme, analjezikler, antipiretikler ve sıvı replasmanını içeren destekleyici tedaviden ibarettir. Dengue virus enfeksiyonu ekarte edilene kadar aspirin ve diğer nonsteroid antienflamatuar ilaçların kullanılmaması, onun yerine öncelikli olarak asetaminofen kullanılması önerilmektedir[42]. Zika virus enfeksiyonlarına için spesifik tedaviler henüz deneme aşamasındadır. Yakın zamanda yayımlanan bir makalede, araştırmacılar insan monoklonal antikorların (ZIKV-117) Zika virus kökenlerini hücre kültürü ve fare modelinde (gebelik süreci de dâhil olmak üzere) nötralize ettiğini gösterdiler[46]. Konvelesan serum veya plazmanın enfeksiyona karşı koruyucu özellikleri de araştırılmış ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir[13].

Diğer viral hastalıklar için onay almış bazı antivirallerin Zika virusa karşı olası tedavi edici etkileri de deneysel olarak araştırılmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, azitromisinin glial hücre dizileri ve astrositlerde viral proliferasyonu ve sitopatik etkilerini azalttığı gösterilmiştir[47]. Bir başka çalışmada, sofosbuvirin multiple insan tümör hücrelerinde ve insan nöronal sistem hücre dizilerinde Zika virus enfeksiyonlarını ve viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir[48]. Yakın zamanda, adenozin trifosfat analoglarının Zika virusun RNA bağımlı RNA polimerazını etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve flavonoidlerin Zika virus NS2B-NS3 proteazı üzerine inhibitör etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da yayımlanmıştır[49,50].

Aşı çalışmaları

Mikrosefali olgularının ve diğer nörolojik komplikasyonların kümülatif olarak artışından sonra Şubat 2016'da DSÖ Zika virus salgınının toplum sağlığını tehdit eden acil bir durum olduğunu deklare etti[10]. Etkilenen kişi sayısının kısa süre içerisinde milyonlara ulaştığı görüldü. Zika virusa karşı oluşan koruyucu immüniteye dair bilgilerimiz şu an için sınırlıdır[14]. Bununla beraber, Dengue virus, Sarıhumma virusu, Tickborne Ensefalit virusu ve JEV gibi diğer flaviviruslara karşı koruyucu aşıların geliştirilmiş olması aşı üreticisi şirketleri Zika virusa yönelik koruyucu aşı üretme yönünde cesaretlendirmiştir[51]. Henüz Zika virusa karşı onaylanmış herhangi bir koruyucu aşı bulunmamakla beraber, 20'den fazla enstitünün bu konuda araştırmalar yaptığı bilinmektedir[52,53]. Bu çalışmaların çoğu hâlen geliştirme aşamasında olup her gün bunlara yenileri ilave edilmektedir (Tablo 1). Son olarak sentetik bir DNA plazmit aşısının (GLS-5700) güvenli olup olmadığını, tolere edilebilirliğini ve immünojen etkinliğini değerlendirmek için yapılması planlanan Faz-1 çalışmalarının FDA (Food and Drug Administration, ABD) tarafından onaylandığı bildirildi[52].

Tablo 1. Zika virus enfeksiyonları için yürütülen koruyucu aşı çalışmaları ve deneysel modeller.

Aşı adı (üretici firma-kurum)	Aşı tipi	Deneysel model	Çalışma sonuçları ve koruyuculuk
prM-Env DNA aşısı (Bharat)	DNA plazmid aşısı	Vero hücre kültürü Balb/c, SJL ve C57BL/6 fare modelleri	Farelerde, üç haftalık süre sonunda viral zarf proteinine özgül antikor yanıtı oluştuğu ELİSA testi ile gösterildi. Tek doz aşılama ile Zika virusa spesifik nötralizan antikor oluştuğu ve tam koruma sağladığı gözlemlendi[51].
ZPIV aşısı (Bharat)	Pürifiye inaktive virus aşısı	Vero hücre kültürü	İntramusküler yoldan yapılan tek doz aşılamanın tam koruma sağladığı gözlemlendi. Faz 1 çalışmalarının yapılması planlama aşamasında[51].
ZPIV aşısı (Bharat)	Pürifiye inaktive virus aşısı	Rhesus maymunu	Aşılanan hayvanların tümünde Zika virus E proteinine spesifik antikor geliştiği ELİSA testi ile gösterildi. Aşılamanın başlangıcından iki hafta sonra mikronötralizasyon testi (MN50) ile bu antikorların nötralizan özelliği ortaya kondu[54].
prM-Env DNA aşısı (Bharat)	DNA plazmid aşısı	Rhesus maymunu	Aşılanan hayvanların tümünde boost immünizasyondan 4 hafta sonra Zika virus spesifik nötralizan antikor titresini ve aynı zamanda saptanabilir Env-spesifik IFNg yanıtlarını indüklediği gösterildi. Yalnızca başlangıç aşılaması yapıldıktan sonra ise düşük titreli yanıt oluştuğu belirlendi[54].
RhAd52-prM-Env aşısı (Bharat)	Adenovirus tip 52 vektör bazlı aşı	Rhesus maymunu	Tek aşılamadan sonra 2. haftada tüm maymunlarda Zika virusa özgü nötralize edici antikor yanıtı geliştiği gözlemlendi. Aşının ilk haftadan sonra Env-spesifik hücresel immün yanıtları indüklediği gösterildi[54].
Ad5 ZIKV-Efl (Pittsburgh Üniversitesi, ABD)	Adenovirus vektör temelli aşı; Kodon optimize Zika virus E antijenini eksprese eden adenovirus serotip-5 vektörü	C57BL/6 fare	Aşılanan farelerden doğan yavruların hepsinde, kilo kaybı veya nörolojik bulgular olmaksızın öldürücü Zika virus enfeksiyonuna karşı koruyucu yanıt geliştiği gösterildi[20].
MNA ZIKV-rEfl (Pittsburgh Üniversitesi, ABD)	Prototip subünit aşı, rekombinant Zika virus E aşısı	C57BL/6 fare	Aşılanan farelerde Zika virus enfeksiyonuna karşı kısmi (%50) koruyucu yanıt alındı[20].
Sentetik DNA aşısı (Wistar)	Zika virusun pre-membran + zarf proteinlerini hedefleyen sentetik DNA aşısı	Fare modeli	Fare modellerinde antijen spesifik hücresel ve hümoral bağışıklık ve nötralizasyon aktivitesi oluşturduğu bildirildi[55].
GLS-5700 (lnOvio/GeneOne)	Zika virus pre-membran ve zarf (prM-Env) proteinlerini kodlayan sentetik DNA plazmid aşısı.	Fare ve rhesus maymunu	Fare ve primat modellerinde olumlu antikor ve T hücre yanıtları elde edildi. Faz-1 çalışmalarının başlatılması FDA tarafından onaylandı[52].
ZIKV mRNA–LNP aşısı	Zika virus pre-membran ve zarf (prM-Env) proteinlerini kodlayan lipid- nanopartikül ile kapsüllenmiş nükleosid modifıye mRNA aşısı	Fare ve rhesus maymunu	Tek seferde düşük doz intradermal aşılama ile fare ve rhesus maymunlarında yüksek düzey nötralizan antikor yanıtı ile koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir[56].

Tablo 1'de özetlenenler dışında Zika virus aşı geliştirme çalışmalarında sarıhumma, Dengue, Lentivirus, Baculovirus ve Measles aşı virusunun vektör olarak kullanıldığı rekombinant, inaktive pürifiye, attenüe ve canlı aşı modelleri ile E-protein nanopartiküllerinin, sentetik peptitlerin ve rekombinan proteinlerin kullanıldığı teknolojiler de denenmektedir[52,53]. Ayrıca çoklu korumayı hedefleyen ve Zika virus ile beraber Sarıhumma ve Chikungunya virus yüzey antijenlerini içeren ikili veya üçlü şimerik aşı modelleri üzerine yapılan çalışmalar da devam etmektedir[53].

Sonuç

Aralık 2016'da DSÖ tarafından Zika virus salgını için ilan edilen acil durumun sonlandırıldığı bildirildi[33,34], ancak Zika virus ve ilişkili tablolar hâlâ önemini korumaya devam etmektedir. Şöyle ki, Zika virus kompetan vektörlerin bulunduğu, ancak virusun henüz ulaşmadığı yeni bölgelere yayılmaya devam etmektedir. Enfeksiyonun henüz ulaşmadığı riskli bölgelerden biri de Akdeniz havzası olup[35], bu bölgede ortaya çıkacak bir salgının ülkemizi de etkileyeceği açıktır. Sonuç olarak, özellikle son bir yıl içerisinde çok sayıda klinik ve deneysel çalışmayla viral replikasyon, enfeksiyonun patofizyolojisi, neden olduğu hastalıkların klinik özellikleri, virusun kıtalararası yayılımı ve global etkileriyle ilgili yüzlerce makale yayımlandı. Bunlara ek olarak koruyucu aşı geliştirme stratejileri ile yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik yoğun çalışmalar devam etmekte olup, literatüre her gün yeni veriler eklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Dick GW.** Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46:521-34. https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90043-6
2. **Fauci AS, Morens DM.** Zika virus in the Americas - Yet another arbovirus threat. *N Engl J Med* 2016; 374:601-4. https://doi.org/10.1056/NEJMp1600297
3. **Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al.** Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009; 360:2536-43. https://doi.org/10.1056/NEJMoa080571
4. **Ioos S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M.** Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* 2014; 44:302-7. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008
5. **Oehler E, Watrin L, Larre P, et al.** Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome-case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill* 2014; 19:pii=20720. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720
6. **Şahiner F.** Zika virus salgınının küresel yayılımı: Güncel bilgiler ve belirsizlikler. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:333-51. https://doi.org/10.5578/mb.24167
7. **Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K.** First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:569-72. https://doi.org/10.1590/0074-02760150192
8. **Brito C.** Zika Virus: A new chapter in the history of medicine. *Acta Med Port* 2015; 28:679-80. https://doi.org/10.20344/amp.7341
9. **Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, et al.** Possible association between Zika virus infection and microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65:59-62. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2
10. World Health Organization. Zika Situation Report, Neurological Syndrome and Congenital Anomalies, 5 February 2016. [http://apps.who.int/iris/bitstream /10665/204348/1/zikasitrep_5Feb2016_eng.pdf?ua=1]. (Erişim tarihi: Aralık 2016).
11. **Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ.** Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46:509-20. https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4
12. **Buathong R, Hermann L, Thaisomboonsuk B, et al.** Detection of Zika virus infection in Thailand, 2012-2014. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 93:380-3. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0022
13. **Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, et al.** Broadly neutralizing activity of Zika virus-Immune sera identifies a single viral serotype. *Cell Rep* 2016; 16:1485-91. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.049
14. **Dawes BE, Smalley CA, Tiner BL, et al.** Research and development of Zika virus vaccines. *NPJ Vaccines* 2016; 1:16007(1-7).
15. **Pyke AT, Daly MT, Cameron JN, et al.** Imported Zika virus infection from the Cook Islands into Australia, 2014. *PLoS Curr* 2014; 6:ecurrents.outbreaks.4635a54dbffba2156fb2fd76dc49f65e.
16. **Shapshak P, Somboonwit C, Foley BT, Alrabaa SF, Wills T, Sinnott JT.** Zika Virus (Chapter 18). In: Shapshak P, Sinnott JT, Somboonwit C, Kuhn J, eds. Global Virology I. Identifying and investigating viral diseases. 1st ed. Springer Publ., New York, 2015:477-500. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2410-3_18
17. **Hayes EB.** Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1347-50. https://doi.org/10.3201/eid1509.090442
18. **Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, et al.** Biology of Zika Virus infection in human skin cells. *J Virol* 2015; 89:8880-96. https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15
19. **Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR.** Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2016; 18:591-6. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.012
20. **Kim E, Erdos G, Huang S, Kenniston T, Falo LD Jr, Gambotto A.** Preventative vaccines for Zika virus outbreak: Preliminary evaluation. *EBioMedicine* 2016; 13:315-20. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.028
21. **Araujo LM, Ferreira ML, Nascimento OJ.** Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2016; 74:253-5. https://doi.org/10.1590/0004-282X20160035
22. **França GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, et al.** Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* 2016; 388:891-7. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3
23. **Niemeyer B, Niemeyer R, Borges R, Marchiori E.** Acute disseminated encephalomyelitis following Zika virus infection. *Eur Neurol* 2016; 77:45-6. https://doi.org/10.1159/000453396
24. **Bell TM, Field EJ, Narang HK.** Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch Gesamte Virusforsch*

1971; 35:183-93.
https://doi.org/10.1007/BF01249709

25. **Li C, Xu D, Ye Q, et al.** Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell* 2016; 19:672.
https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.017
26. **Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, et al.** The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 2016; 534:267-71.
https://doi.org/10.1038/nature18296
27. **Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, et al.** Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* 2016; 352:816-8.
https://doi.org/10.1126/science.aaf6116
28. **de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, et al.** Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol* 2016; 134:529-35.
https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0267
29. **Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R Jr.** Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet* 2016; 387:228.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00006-4
30. **Alpert SG, Fergerson J, Noël LP.** Intrauterine West Nile virus:ocular and systemic findings. *Am J Ophthalmol* 2003; 136:733-5.
https://doi.org/10.1016/S0002-9394(03)00452-5
31. **Miner JJ, Sene A, Richner JM, et al.** Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep* 2016; 16:3208-18.
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.079
32. **Furtado JM, Espósito DL, Klein TM, Teixeira-Pinto T, da Fonseca BA.** Uveitis associated with Zika virus infection. *N Engl J Med* 2016; 375:394-6.
https://doi.org/10.1056/NEJMc1603618
33. World Health Organization. Situation Report Zika Virus Microcephaly Guillain-Barré Syndrome, 24 November 2016. [http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/24-november-2016/en/]. (Erişim tarihi: Aralık 2016).
34. US Department of Health and Human Services, CDC. All Countries & Territories with Active Zika Virus Transmission, last updated: November 21, 2016. [http://www.cdc.gov/zika/geo/active-countries.html]. (Erişim tarihi: Aralık 2016).
35. **Escadafal C, Gaayeb L, Riccardo F, et al.** Risk of Zika virus transmission in the Euro-Mediterranean area and the added value of building preparedness to arboviral threats from a One Health perspective. *BMC Public Health* 2016; 16:1219.
https://doi.org/10.1186/s12889-016-3831-1
36. **Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM.** Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 47:6-7.
https://doi.org/10.1002/uog.15831
37. **Grischott F, Puhan M, Hatz C, Schlagenhauf P.** Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel Med Infect Dis* 2016; 14:313-30.
https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.07.002
38. **Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, et al.** Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:880-2.
https://doi.org/10.3201/eid1705.101939
39. **Musso D, Nhan T, Robin E, et al.** Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* 2014; 19:pii=20761.
https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761
40. **Swaminathan S, Schlaberg R, Lewis J, Hanson KE, Couturier MR.** Fatal Zika virus infection with secondary nonsexual transmission. *N Engl J Med* 2016; 375:1907-9.
https://doi.org/10.1056/NEJMc1610613
41. **Leung GH, Baird RW, Druce J, Anstey NM.** Zika virus infection in Australia following a monkey bite in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015; 46:460-4.
42. **Şahiner F, Sığ AK, Savaşçı U, Tekin K.** Gebelikte Zika virus enfeksiyonları: Salgınlar ve olgu yönetimi. *Cukurova Med J* 2016; 41:143-51.
https://doi.org/10.17826/cutf.159192
43. **Staples JE, Dziuban EJ, Fischer M, et al.** Interim guidelines for the evaluation and testing of infants with possible congenital Zika virus infection - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65:63-7.
https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e3
44. **Fontes BM.** Zika virus-related hypertensive iridocyclitis. *Arq Bras Oftalmol* 2016; 79:63.
https://doi.org/10.5935/0004-2749.20160020
45. **Ventura CV, Maia M, Travassos SB, et al.** Risk factors associated with the ophthalmoscopic findings identified in infants with presumed Zika virus congenital infection. *JAMA Ophthalmol* 2016; 134:912-8.
https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.1784
46. **Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, et al.** Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature* 2016; 540:443-7.
https://doi.org/10.1038/nature20564
47. **Retallack H, Di Lullo E, Arias C, et al.** Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:14408-13.
https://doi.org/10.1073/pnas.1618029113
48. **Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, et al.** The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res* 2016; 137:134-40.
https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.023
49. **Hercík K, Kozak J, Šála M, et al.** Adenosine triphosphate analogs can efficiently inhibit the Zika virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res* 2016; 137:131-3.
https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.020
50. **Lim HJ, Nguyen TT, Kim NM, Park JS, Jang TS, Kim D.** Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship. *Biotechnol Lett* 2017; 39:415-21.
https://doi.org/10.1007/s10529-016-2261-6
51. **Larocca RA, Abbink P, Peron JP, et al.** Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* 2016; 536:474-8.
https://doi.org/10.1038/nature18952
52. **Tripp RA, Ross TM.** Development of a Zika vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2016; 15:1083-5.
https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1192474
53. World Health Organization. Vaccine Pipeline Tracker, Zika Virus. [https://docs.google.com/spreadsheets/d/19otvINcayJURCMg76xWO4KvuyedYbMZDcXqbyJGdcZM/pubhtml#]. (Erişim tarihi:Aralık 2016).
54. **Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, et al.** Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* 2016; 353:1129-32.
https://doi.org/10.1126/science.aah6157
55. **Muthumani K, Griffin BD, Agarwal S, et al.** In vivo protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prMEnv DNA vaccine. *NPJ Vaccines* 2016; 1:16021.
https://doi.org/10.1038/npjvaccines.2016.21
56. **Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al.** Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* 2017; 543:248-51.
https://doi.org/10.1038/nature21428

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):106-113, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.106

Araştırma

Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinden Elde Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Çeşitli Virülans Faktörlerine Kurkuminin Etkisi

Reyhan MUTLU, Aynur EREN TOPKAYA
Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ

ÖZ

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa sahip olduğu virülans faktörleri ve antibiyotiklere direnç mekanizmaları ile kistik fibrozlu hastalarda tedavisi zor olan solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Kurkuminin anti-inflamatuvar, anti-tümör gibi etkilerinin yanı sıra antibakteriyel etkiye de sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın amacı, kistik fibrozlu hastaların solunum yolu örneklerinden elde edilen P. aeruginosa izolatlarının çeşitli virülans faktörlerine (biyofilm, elastaz, alkali proteaz) kurkuminin etkisinin araştırılmasıdır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmamızda, P. aeruginosa izolatlarının (n=65) kurkumin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri agar dilüsyon yöntemiyle çalışıldı. Virülans faktörlerinden biyofilm, elastaz ve alkali proteaz mikroplakta absorbans ölçümüne dayalı yarı kantitatif yöntemlerle araştırıldı. Virülans faktörü üretimi pozitif olan izolatlar aynı anda hem sub-MİK konsantrasyondaki kurkumine maruz bırakılarak hem de bırakılmadan virülans faktörü üretimini araştırmak için yeniden çalışıldı ve ölçülen absorbans değerleri istatiksel olarak karşılaştırıldı.*

Bulgular: *Çalışmamızda, izolatların 11'inin (%16) kurkumin MİK değeri 250-500 µg/ml arasında, 7'sinin (%11) kurkumin MİK değeri 501-1000 µg/ml arasında, 5'inin (%8) kurkumin MİK değeri 1001-1500 µg/ml arasında ve 42'sinin (%65) kurkumin MİK değeri 1500 µg/ml üzerinde saptandı. İzolatların %54'ünde biyofilm üretimi, %74'ünde elastaz üretimi ve %68'inde alkali proteaz üretimi pozitif bulundu. Çalışılan bu üç virülans faktörünün üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonlarda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.*

Sonuç: *Çalışmamızın sonuçlarına göre, in-vitro ortamda bir kez kurkumine maruz bırakılan kistik fibroz izolatlarının virülans faktörlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmamıştır. Bununla birlikte, kurkuminin toksik olmayan, anti-inflamatuvar ve anti bakteriyel bir madde olması nedeniyle bu hasta gruplarında uzun süreli kullanımının in-vivo etkilerinin de araştırılması uygun olacaktır.*

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa, kistik fibröz, kurkumin*

ABSTRACT

The Effect of Curcumin on Several Virulance Factors of Pseudomonas aeruginosa Isolates Obtained From Respiratory Tract Samples of Cystic Fibrosis Patients

Objective: *Pseudomonas aeruginosa causes respiratory tract infections that are difficult to treat in patients with cystic fibrosis because of the antibiotic resistance mechanisms and virulence factors. Curcumin has been found to possess antibacterial as well as antitumoral and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to investigate the effect of curcumin on several virulence factors (biofilm, elastase, alkaline protease) of P. aeruginosa isolates which were obtained from respiratory tract samples of cystic fibrosis patients.*

Material and Methods: *In our study, minimal inhibitory concentration (MIC) values of curcumin for P. aeruginosa isolates (n=65) were determined by agar dilution method. Production of three different virulence factors (elastase, alkaline protease, and biofilm) were investigated by semi-quantitative methods which relied on the measurement of absorbance in microtiter plates. The isolates which had a positive virulence factor production were retested for the production of virulence factors at the presence and absence of sub-MIC curcumin concentrations simultaneously and measured absorbance values were compared statistically.*

Results: *In our study, curcumin MICs of the 11 (16%) isolates were 250-500 µg/ml 501-1000 µg/m for 7 (11%), 1001-1500 µg/ml for 5 (8%), and above 1500 µg/ml for 42 (65%) isolates. Out of 65 isolates in 54% biofilm, in 74% elastase, and in 68% alkaline protease production were positive. In terms of virulence factor production, results didn't indicate a statistically significant difference between the absorbance values obtained with and without exposure to sub-MIC concentrations of curcumin.*

Conclusion: *In conclusion, there was no statistically significant decrease in the virulence factors of cystic fibrosis isolates which were once exposed to in vitro curcumin. However, because curcumin is a non-toxic, anti-inflammatory and anti-bacterial agent, it will be suitable to investigate the in vivo effects of long-term curcumin use in these patient groups.*

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa, cystic fibrosis, curcumin*

Alındığı tarih: 31.01.2017
Kabul tarihi: 02.05.2017
Yazışma adresi: Aynur Eren Topkaya, Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ
e-posta: aynurtopkaya@yahoo.com

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa en önemli *Pseudomonas* türü olup, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda mortalite ve morbidite ile sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *P. aeruginosa* enfeksiyonları; bakterinin bağlanması ve kolonize olması, lokal invazyon, yayılım ve sistemik hastalık olarak birbirini takip eden üç basamağa ayrılabilir[1-3].

Mukozalara *Pseudomonas* kolonizasyonu, pili veya fimbria aracılığıyla bakterinin epitel hücrelerine bağlanmasıyla olur [3]. Sağlıklı bireylerde farengeal kolonizasyonu sıklığı %0.6-6 olup, nazal mukozada %0.3-3, deride %0-2, dışkıdan %2.6-24 oranlarında saptanabilmektedir. Hastanede yatan risk altındaki bireylerde ise *P. aeruginosa* kolonizasyon oranı %50'lere ulaşabilmektedir[4]. Elastaz, alkali proteaz, ekzotoksin A, fosfolipaz C gibi tip 2 sekresyon sistemini kullanarak hücre dışına salınan virülans faktörleri de, solunum yolu epitelinin koruyucu glikokaliks yapısını bozarak epitelyal ligandları açığa çıkarır ve bakterinin invazyonunda görev alırlar[1,5].

Otozomal resesif geçişli kistik fibroz (KF) hastalığında, ya epitel hücresi membranında klorür iletiminden sorumlu kanalın düzenleyici proteini olan Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) proteini üretilmez ya da işlevsel olmayan bir protein üretilir. CFTR üretiminde kayıp veya fonksiyonlarında bozulma sonucu akciğerlerde mukosilyer klirens bozulur ve mukus birikimine neden olur. Bu da KF'li hastalarda inflamasyona ve ciddi pnömoniye neden olabilen *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonuna yol açar. KF hastalarının %80'inden fazlası yetişkin döneme kadar *P. aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonu geçirirler[6].

Pseudomonas aeruginosa'nın tanımlanmış birçok virülans faktörü vardır. En önemlilerinden birisi elastazdır. Bu enzim solunum yolu mukozasında epiteller arasındaki sıkı bağlantıları parçalayarak geçirgenlik artışına ve enfeksiyon bölgesinde nötrofillerin çoğalmasına yol açar[5]. Elastaz ayrıca, fibronektini yıkar ve mukozal yüzeyde bakteri adezyonunu kolaylaştırır, reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar. Bronş epitelinin bütünlüğünü bozarak silyer aktiviteyi engeller. Damar duvarındaki kollajenin yıkılması ve damar bütünlüğünün bozulması ile hemorajik ve nekrotik lezyonların oluşmasına ve böylece akciğerde alveol yapısının bozulmasına yol açar[7]. *P. aeruginosa*'nın diğer bir virulans faktörü olan alkali proteazın fibrin eritici etkisi vardır. 49 kDa ağırlığında apr geni tarafından kodlanan bir metalloproteazdır. Akut akciğer hasarında erken dönemde etkili olduğu gösterilmiştir[8]. Biyofilmler, KF zemininde gelişen akciğer enfeksiyonları, diş çürükleri, endokardit, kontak lenslerle ilgili göz enfeksiyonları, iç kulak enfeksiyonları ve böbrek taşları gibi birçok enfeksiyon gelişiminde önem taşır[9]. KF'da *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kronik solunum yolu enfeksiyonları biyofilm oluşumu ile karakterize enfeksiyonlara en iyi örneklerden biridir. Bu olguların yaşları ilerledikçe solunum yolları biyofilm oluşumu ile karakterize mukoid koloni fenotipinde *P. aeruginosa* ile kolonize ve enfekte olmakta ve bu aşamadan sonra eradikasyon hemen hemen olanaksız hâle gelmektedir[10]. *P. aeruginosa*'nın erken eradikasyonu için inhale tobramisin ve kolistin kullanımının uzun süreli başarısı değerlendirilmekte olup, eradikasyon tedavisinde kullanılabilecek yeni antibiyotikler araştırılmaktadır. Kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının inhale antibiyotiklerle tedavisi ise halen aktif bir araştırma konusudur. Akut pulmoner alevlenmeler morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir ve intravenöz kombine antibiyotik tedavisi önerilmektedir. Kistik fibrozlu hastalarda enfeksiyon etkeni olan *P. aeruginosa* izolatlarında çoklu ilaç direncinin yaygın olması nedeniyle yeni antibiyotiklere ve başka tedavi stratejilerine acil olarak gereksi-

nim duyulmaktadır[11].

Kurkumin, turmerik (zerdeçal) olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilmektedir[12]. *C. longa*, Çin ve Hindistan'da yaygın olarak üretilen büyük yapraklı, sarıçiçekli bitki olup, *Zingiberaceae* ailesinde yer almaktadır[13]. Antik çağlardan bu yana turmerik bir baharat olarak Hindistan ve diğer Asya ülkelerinde popüler olmuştur[12]. Baharat, gıda katkı maddesi ve renklendirici madde olarak kullanılmasının yanında turmerik, geleneksel olarak artrit, ülser, sarılık, yara, ateş, travma ve psöriazis gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için de kullanılmaktadır[14].

Kurkuminin antioksidan, anti-inflamatuvar, antiviral, antifungal, antibakteriyel etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, kurcuminin sub-MİK düzeylerinde, KF'li hastaların solunum yolu örneklerinden etken olarak izole edilen *P. aeruginosa* izolatları tarafından üretilen elastaz, biyofilm üretimi, alkali proteaz gibi çeşitli virülans faktörlerine etkisinin belirlenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kistik Fibrozis Polikliniği'ne başvuran KF'li hastaların solunum yolu örneklerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatları (n=65) kullanıldı. Tanımlama, MacConkey agarda üreyen gram negatif, basil morfolojisindeki laktoz negatif görünümlü nonfermentatif kolonilere oksidaz testi uygulanması yanısıra, tipik koloni morfolojisi ve pigment üretimine göre konvansiyonel yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Bu şekilde tanımlanamayan izolatlar 2013 Eylül tarihine kadar Phoenix otomatize bakteri tanımlama sistemiyle (Becton Dickinson, ABD), 2013 Eylül sonrası da VITEK-MS (bioMérieux, Fransa) kullanılarak tanımlanmıştır. Çalışma Namık Kemal Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak izolatların kurkumin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Daha sonra izolatların virülans faktörleri üretimi (elastaz, biyofilm üretimi, alkali proteaz) araştırılmıştır. Virülans faktörü üretimi pozitif olan izolatlar sub-MİK düzeyde kurkumine maruz bırakılarak ve maruz bırakılmadan yeniden virülans faktörü üretimi çalışıldı ve her iki absorbans değeri istatiksel olarak karşılaştırıldı. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni, negatif kontrol olarak steril Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri kullanıldı.

Agar Dilüsyon Yöntemi ile İzolatların Kurkumin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Stok çözeltilerin hazırlanması: Çözelti hazırlanırken, tartılacak kurkumin (Sigma) miktarı veya sulandırma hacmi, antimikrobiyal maddenin potensi dikkate alınarak hesaplandı[15]. Kurkumin stok çözeltileri hazırlanırken çözücü olarak dimetilsülfoksit (DMSO), sulandırıcı olarak fosfatla tamponlamış fizyolojik tuzlu su (PBS) kullanılmıştır[16]. Firma tarafından bildirilen %76 saflıktaki kurkuminin 269.4 mg'ı önce beş ml DMSO içerisinde çözüldükten sonra PBS ile sulandırılarak 5120 µg/ml konsantrasyonda 40 ml'lik kurkumin stok ana çözeltisi elde edildi. 5120 µg/ml konsantrasyondaki bu ana kurkumin çözeltisinden PBS ile çift katlı seri sulandırımlar yapılarak 2560 µg/ml, 1280 µg/ml, 640 µg/ml, 320 µg/ml, 160 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml kurkumin içeren ara konsantrasyonlar hazırlandı.

Agar dilüsyon plaklarının hazırlanması: Kurkuminin ara konsantrasyonlarından bir kısım, sıcaklığı su banyosunda 45-50°C'ye getirilen dokuz kısım Mueller-Hinton (MH) agar besiyerine eklendi. Böylece final kurkumin konsantrasyonları 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml,

1 µg/ml olan agar dilüsyon plakları elde edildi.

İnokülumun hazırlanması, inokülasyon ve değerlendirme: Hasta izolatlarının %5 koyun kanlı ağara pasajları yapılarak 35±2°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası besiyeri üzerindeki tek düşmüş kolonilerden alınarak serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklığında $2x10^8$ koloni oluşturan birim/ml (KOB/ml) bakteri süspansiyonu elde edildi. Bu bakteri süspansiyonundan 10 µl alınarak kurkumin içeren MH agar plaklara inoküle edildi. Plaklar 35±2°C'de 16-18 saat inkübe edildi ve koyu renkli ışığı yansıtmayan bir yüzey üzerinde değerlendirildi. Üremeyi inhibe eden en düşük kurkumin konsantrasyonu MİK olarak belirlendi[16]. Bazı izolatların kurkumin MİK değerlerinin 256 µg/ml'nin üzerinde çıkması üzerine bu izolatların kurkumin MİK değerleri hazırlanan 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml, 1200 µg/ml ve 1500 µg/ml kurkumin konsantrasyonlarıyla aynı yöntem kullanılarak yeniden çalışıldı.

Virülans faktör üretiminin saptanması

Kökenlerin stok kültürlerinden Kanlı agar besiyerine pasajlanarak bir gece inkübasyondan sonra elde edilen saf kültürlerden, bulanıklık 0.5 Mc Farland olacak şekilde üç ml LB sıvı besiyeri içeren tüplere alınarak bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu karışımdan 0.1 ml alınarak 9.9 ml Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine aktarılarak, 10^6 KOB/ml bakteri içeren 10 ml'lik süspansiyon elde edildi. Hazırlanan bu süspansiyondan 2.5 ml alınıp 2.5 ml sıvı besiyerine eklenip $5x10^5$ KOB/ml bakteri içeren beş ml karışım elde edilerek 35°C'de çalkalayıcılı etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası aşağıda tanımlandığı gibi virülans faktörlerinin (elastaz, biyofilm üretimi, alkali proteaz) üretimi çalışıldı.

Biyofilm üretiminin saptanması: Biyofilm üretiminin saptanması amacıyla, *P. aeruginosa* klinik izolatları (n=65) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonlarının taze LB sıvı besiyeri içerisinde 1: 100 oranında sulandırımları yapıldı ve bu sulandırımlardan her bir köken için 100'er µl mikrodilüsyon plaklarındaki üç kuyucuğa dağıtıldı. 35°C'de 8 saat inkübasyon sonrasında plaklar üçer kez distile su ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa %0.1'lik kristal viyole çözeltisinden onar µl eklenerek plaklar oda ısısında 15 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra plaklar yine üçer kez distile su ile yıkanarak serbest boya çözeltisi uzaklaştırıldı. Oluşan biyofilmin kantitasyonu amacıyla kuyucuklara 200 µl %95'lik etanol eklenerek biyofilm ile bileşik oluşturan kristal viyolenin çözülmesi gerçekleştirildi. Beş dakika beklendikten sonra absorbans değerleri 550 nm'de ELISA plak okuyucu (Multiskan GO, Thermo Fisher Sci) ile ölçüldü[17]. Eşik değerin (cut-off) belirlenmesi Karatuna ve ark.[18] tarif ettiği gibi, biyofilm üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri için elde edilen absorbans değerlerinin ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değer 0.173 olarak belirlendi, 550 nm'de absorbans değeri >0.173 saptanan kökenler biyofilm üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi.

Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda biyofilm üretimine etkisinin araştırılması: Biyofilm üretimi pozitif bulunan 16 izolat aynı zamanda hem sub-MİK dozlarda kurkumine maruz bırakılarak hem de kurkumine maruz bırakılmadan biyofilm üretimi ölçülerek elde edilen sonuçlar istatiksel olarak karşılaştırıldı. Bunun için 67.1 mg kurkumin iki ml DMSO içinde çözüldükten sonra karışım PBS ile 10 ml'ye tamamlanarak 5000 µg/ml'lik kurkumin solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon PBS ile sulandırılarak 2500 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml'lik kurkumin solüsyonları elde edildi. 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml kurkumin solüsyonlarından 0.5 ml alınıp iki

ml LB sıvı besiyeri ile karıştırılarak 2.5 ml 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml kurkumin içeren solüsyonlar hazırlandı. Yukarıda virülans faktörü üretiminin saptanması bölümünde anlatıldığı gibi izolatlar sıvı besiyeri içerisinde sulandırılarak 10^6 KOB/ml bakteri içeren 10 ml süspansiyon elde edildi. 10^6 KOB/ml bakteri içeren bu süspansiyondan 2.5 ml alınıp kurkumin MİK değeri 256 µg/ml bulunan izolatlar için 2.5 ml 200 µg/ml, 500 µg/ml bulunan izolatlar için 2.5 ml 300 µg/ml, 1200 µg/ml bulunan izolatlar için 2.5 ml 500 µg/ml, 1500 µg/ml üzerinde bulunan izolatlar için 2.5 ml 1000 µg/ml kurkumin içeren solüsyonlarla karıştırıldı. Böylece kurkumin MİK değeri 256 µg/ml bulunan izolatlar 100 µg/ml kurkumine, kurkumin MİK değeri 500 µg/ml olarak bulunan izolatlar 150 µg/ml kurkumine, kurkumin MİK değeri 1200 µg bulunan izolatlar 250 µg/ml kurkumine, kurkumin MİK değeri 1500 µg/ml üzerinde bulunan izolatlar 500 µg/ml kurkumine maruz bırakıldı. Bu izolatlardan eşzamanlı olarak kurkumine maruz bırakılmadan da hazırlanarak 35°C'de çalkalayıcılı etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılan ve kurkuminsiz örneklere aynı anda biyofilm üretimi çalışılarak absorbans değerleri ölçüldü ve sonuçlar istatiksel olarak karşılaştırıldı.

Elastaz üretiminin saptanması: İzolatların elastaz üretimi Iglewski'nin[19] yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Klinik *P. aeruginosa* izolatları (n=65) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonları soğutmalı santrifüjde çevrilerek elde edilen süpernatanlardan 0.5 ml alınarak 1 ml deney karışımı (30 mM Tris ve 10 mg elastin kongo kırmızısı; pH: 7.2) içeren tüplere eklendi ve 37°C'de 6 saat inkübe edildi. Takiben tüpler 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve her bir izolat için ikişer kuyucuğa 200 µl süpernatan koyularak absorbans değerleri 490 nm'de ELİSA plak okuyucu (ELx800, BioTek Ins) ile ölçüldü. Her izolat için 2 kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu işlem 2 ayrı çalışmada daha yinelendi. Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla Karatuna ve ark.[18] yöntemiyle elastaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değer 0.145 olarak belirlendi, 490 nm'de absorbans değeri >0.145 saptanan kökenler elastaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi.

Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda elastaz üretimine etkisinin araştırılması: Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda elastaz üretimine etkisinin araştırılması amacıyla elastaz üretimi pozitif bulunan 21 izolat 500 µg/ml kurkumine maruz bırakıldı. Bu izolatlar aynı zamanda kurkumine maruz bırakılmadan da hazırlanarak 35°C'de çalkalayıcılı etüvde 24 saat inkübe edildi. Enkübasyon sonrası sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılan ve kurkuminsiz örneklere aynı anda yukarıda anlatıldığı gibi elastaz üretimi çalışılarak absorbans değerleri ölçüldü ve sonuçlar istatiksel olarak karşılaştırıldı.

Alkali proteaz üretiminin saptanması: İzolatların alkali proteaz üretimi Howe ve Iglewski'nin[20] yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Klinik *P. aeruginosa* izolatları (n=65) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonlarının taze LB sıvı besiyeri içerisinde 1:100 oranında sulandırımları yapıldı ve bu sulandırımlardan 0.5 ml alınarak yine beş ml LB besiyerine ekildi ve çalkalayıcılı etüvde 30°C'de 24 saat inkübe edildi. 3000 g'de 20 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatanlardan 500 µl, 1.5 ml deney karışımı [20 mM Tris-HCl, 1 mM $CaCl_2$ tampon çözeltisinden (pH=8) 1.5 ml ve 50 mg Hide Remazol Brilliant Blue] içeren tüplere eklenip 35°C'de bir saat çalkalayıcılı etüvde inkübe edildi. Bu işlem son-

rası tüpler 4000 g'de beş dakika santrifüj edildi ve her bir izolat için ikişer kuyucuğa 200 µl süpernatan koyularak absorbans değerleri 630 nm'de ELISA plak okuyucu (ELx800, BioTek Ins) ile ölçüldü. Her izolat için iki kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu işlem iki ayrı çalışmada daha yinelendi. Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla, Karatuna ve ark.[18] tarif ettiği gibi alkali proteaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değer 0.104 olarak belirlendi, 630 nm'de absorbans değeri >0.104 saptanan kökenler alkali proteaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi.

Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda alkali proteaz üretimine etkisinin araştırılması: Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda alkali proteaz üretimine etkisinin araştırılması amacıyla alkali proteaz üretimi pozitif bulunan 16 izolat aynı zamanda hem sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak hem de kurkumine maruz bırakılmadan alkali proteaz üretimi ölçülerek elde edilen sonuçlar istatiksel olarak karşılaştırıldı. 5000 µg/ml'lik kurkumin stok solüsyonundan 0.5 ml alınıp iki ml LB sıvı besiyeri ile karıştırılarak 2.5 ml 1000 µg kurkumin solüsyonu elde edildi. Sıvı besiyeri içerisinde 10^6 KOB/ml bakteri solüsyonundan 2.5 ml alınıp, kurkumin MİK'i 1500 µg/ml'nin üstünde bulunan izolatlar için 2.5 ml 1000 µg/ml kurkumin içeren solüsyonla karıştırıldı. Böylece izolatlar 500 µg/ml kurkumine maruz bırakıldı. Bu izolatlar aynı zamanda kurkumine maruz bırakılmadan da hazırlanarak 35°C'de çalkalayıcılı etüvde 24 saat inkübe edildi. Enkübasyon sonrası sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılan ve kurkuminsiz örneklere aynı anda elastaz üretimi çalışılarak absorbans değerleri ölçüldü ve sonuçlar istatiksel olarak karşılaştırıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 18.0 ile iki yönlü olarak %95 güven aralığında yapıldı. Tanımlayıcı istatistiklere ek olarak (ortalama, standart sapma, yüzdelik değer vb.), karşılaştırmalı analizlerde bağımlı gruplarda non parametrik bir test olan Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulandı. İzolatlar kurkumin MİK değerlerine göre dört gruba ayrıldı. Her gruba ait biyofilm absorbans değerleri Kruskal-Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldı. Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlenmek için ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

BULGULAR

Kistik fibrozlu hastalardan elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının (n=65) agar dilüsyon yöntemiyle belirlenen kurkumin MİK değerlerinin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İzolatların kurkumin MİK aralığına göre dağılımı.

MİK (µg/ml)	250-500	501-1000	1001-1500	1500 üzeri
İzolat sayısı [n, (%)]	11 (16)	7 (11)	5 (8)	42 (65)

Virülans faktörleri için negatif kontrol kökenleri (*P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3) ile gerçekleştirilen testler sonucunda eşik değerler (cut-off) saptandı ve bu değerler kullanılarak klinik *P. aeruginosa* izolatlarının (n=65) virülans faktör üretimleri belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. İzolatların virülans faktörü üretiminin değerlendirilmesi.

Virülans Faktörü	Eşik değerler	Negatif izolat sayısı n, %	Pozitif izolat sayısı n, %
Biyofilm	0.173	30 (46)	35 (54)
Elastaz	0.145	17 (26)	48 (74)
Alkali Proteaz	0.104	21 (32)	44 (68)

İzolatların %54'ünde biyofilm üretimi, %74'ünde elastaz üretimi ve %68'inde alkali proteaz üretimi

pozitif bulundu. Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonlarda virülans faktörü üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla virülans faktörü üretimi pozitif olan izolatlar arasından seçilen izolatlara aynı anda kurkuminli ve kurkuminsiz olarak virülans faktörü üretimi çalışıldı. Ölçülen absorbans değerlerinin ortalamaları ve p değerleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kurkuminsiz (kurkumin negatif) ve sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak (kurkumin pozitif) virülans faktörü üretimi çalışılan izolatların ortalama absorbans değerleri ve p değerleri.

Virülans Faktörü	Kurkumin (-) ortalama	Kurkumin (+) ortalama	p değeri
Biyofilm	0.250	0.279	0.363
Elastaz	0.201	0.303	0.131
Alkali Proteaz	0.302	0.368	0.552

Biyofilm üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.363).

Elastaz üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonlarda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.131).

Alkali proteaz üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.552).

TARTIŞMA

Bu çalışmada KF'li hastaların solunum yollarından elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının kurkumin MİK' leri, çeşitli virülans faktörleri (biyofilm, elastaz, alkali proteaz) ve kurkuminin sub-MİK konsantrasyonlarda virülans faktörlerine etkisi araştırıldı.

Çalışmamızda, agar dilüsyon yöntemiyle 65 *P. aeruginosa* izolatının kurkumin MİK değerleri araştırıldı. İzolatların 11'inin (%16) MİK değeri 250-500 µg/ml arasında, yedisinin (%11) MİK değeri 501-1000 µg/ml arasında, beşinin (%8) MİK değeri 1001-1500 µg/ml arasında ve 42'sinin (%65) MİK değeri 1500 µg/ml üzerinde saptandı. Güneş ve ark.[23] yaptığı çalışmada, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun kurkumin MİK değeri 175 µg/ml olarak bulunmuştur. Negi ve ark.[24] 30 çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatının kurkumin MİK değerlerinin 50 µg/ml üzerinde olduğunu saptamışlardır. Literatürde, klinik *P. aeruginosa* izolatlarında kurkuminin MİK değerlerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bu iki çalışmada çalışmamıza göre daha düşük MİK değerlerinin saptanmış olmasının yöntem farklılığına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, virülans faktörleri üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonlarda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05). Rudrappa ve Bais[25] tarafından yapılan bir çalışmada bitki ve hayvan patojenite modelleriyle kurkuminin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun virülans faktörlerine etkisi araştırılmış ve kurkuminin biyofilm oluşumu, elastaz/proteaz aktivitesi, piyosiyanin sentezi ve AHL üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Packiavathy ve ark.[26] *P. aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli, Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens* suşlarında kurkuminin biyofilm oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir. 100 µg/ml konsantrasyonda kurkuminine maruz bırakılan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm kütlesinin %89 azaldığı ve aynı konsantrasyonda kurkuminin etkisi ile EPS üretiminin %97 düştüğünü göstermişlerdir. Ancak aynı çalışmada kurkumin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun olgun biyofilmine karşı etkili bulunmamıştır. Sethupathy ve ark.[27] yaptığı çalışmada ise,

sürekli kurkumin maruziyetinin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde 20 pasaj boyunca güçlü bir proteaz, elastaz, piyosiyanin ve biyofilm inhibitörü olduğu gösterilmiştir.

Her ne kadar kurkumine bir kez maruz bırakılan *P. aeruginosa* izolatlarının araştırdığımız vırülans faktörlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamış (p>0.05) olsa da, farmakodinamik özellikleri, anti-inflamatuvar ve antibakteriyel etkileri gözönünde bulundurulduğunda, KF'li hastalarda in-vivo çalışmalarla uzun süreli kurkumin kullanımının araştırılması uygun olacaktır.

TEŞEKKÜR

Kistik fibrozlu hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarını sağladığı için Prof. Dr. Burçin Şener'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **D'Agata E.** *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* Species. In: Bennett JE, Dolin R, Blasser JM (eds.). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th Edition, Philedelphia: Elsevier-Saunders; 2015:2518-31.
2. **Murray PR, Rosental KS, Pfaller MA.** *Pseudomonas* ve ilişkili bakteriler (çeviri: P. Çıragil). Başustaoğlu AC (Editör). Tıbbi Mikrobiyoloji. Ankara: Atlas Kitapçılık 2010:333-41.
3. **Vahaboğlu H, Akhan S.** *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:2175-86.
4. **Erdem B.** Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (çeviri). Editör(ler) Mutlu G, Emir T, Cengiz AT, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö. Ankara: Güneş Kitapevi. 1999:733-8.
5. **Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J.** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006; 36:78-91. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007
6. **Lovewell RR, Patankar RY, Berwin B.** Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 20143; 306:L591-603. https://doi.org/10.1152/ajplung.00335.2013
7. **Alcorn JF, Wright JR.** Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* 2004; 279:30871-9. https://doi.org/10.1074/jbc.M400796200
8. **Kipnis E, Guery BP, Tournoys A, et al.** Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* - induced acute lung injury. *Shock* 2004; 21:444-51. https://doi.org/10.1097/00024382-200405000-00008
9. **Walker TS, Tomlin KL, Worthen GS, et al.** Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect Immun* 2005; 73:3693-701. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005
10. **Altun HU, Şener B.** Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg* 2008; 39:82-8.
11. **Langan KM, Kotsimbos T, Peleg AY.** Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28:547-56. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000217
12. **Jurenka JS.** Anti-inflammatory properties of kurkumin, a major constituent of Curcuma longa: A review of preclinical and clinical research. *Alter Med Rev* 2009; 14:141-53.
13. **Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S.** Kurkumin derived from turmeric *(Curcuma longa)*. In: Bagchi D, Preuss HG, Eds. Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention. Boca Raton: CRC Press; 2005:349-87.
14. **Singh S.** From exotic spice to modern drug? *Cell* 2007; 130:765-8. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.024
15. **CLSI.** Clinical Laboratory Standarts Institute. Aerop üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri. Onaylanmış Standart M07-A8, Sekizinci Baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2009.
16. **Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K.** Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One* 2015; 10:e0121313. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121313
17. **O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, Kolter R.** Genetic approaches to study biofilms. *Methods Enzymol* 1999; 310:91-109. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10008-9
18. **Karatuna O.** Solunum sistemi enfeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi. [Tıpta Uzmanlık Tezi] İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2008.
19. **Rust L, Messing CR, Iglewski BH.** Elastase assays. *Methods Enzymol* 1994; 235:554-62. https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35170-8
20. **Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, et al.** Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol (1985)* 1993; 75:1661-9.
21. **Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS).** Bakteri Tanımlama ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri Standart Uygulama Prosedürleri (SUP). Revizyon No.1, Ocak 2014. Mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/uamdss/adt-sup.html?download=444:adt-sup. Erişim tarihi: Aralık 2016.
22. **CLSI.** Clinical Laboratory Standarts Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement, M100-S24, Clinical Laboratory Standarts Institute, 2014.
23. **Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE.** Antibacterial effects of kurkumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health* 2016; 32:246-50. https://doi.org/10.1177/0748233713498458
24. **Negi N, Prakash P, Gupta ML, Mohapatra TM.** Possible role of curcumin as an efflux pump inhibitor in multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:DC04-7. https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8329.4965
25. **Rudrappa T, Bais HP.** Curcumin, a known phenolic from Curcuma longa, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J Agric Food Chem* 2008; 56:1955-62. https://doi.org/10.1021/jf072591j
26. **Packiavathy IA, Priya S, Pandian SK, Ravi AV.** Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem* 2014; 148:453-60. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.002
27. **Sethupathy S, Prasath KG, Ananthi S, Mahalingam S, Balan SY, Pandian SK.** Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stres response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production. *J Proteomics* 2016; 145:112-26. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.019

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):114-124, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.114

Araştırma

Candida Cinsi Mayaların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Analizi[§]

Hatice ERDEM*, Sidre ERGANİŞ*, Ebru EVREN, Fatma Nur AKSAKAL***, Kayhan ÇAĞLAR*, Ayşe KALKANCI***

**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara*

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

****Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara*

ÖZ

Amaç: *İnsanlarda en sık hastalık etkeni olan Candida cinsi mayaların tür düzeyinde tanımlanmaları tedavi seçeneklerini değiştirdiği için büyük önem taşımaktadır. Klasik tanı yöntemlerini kullanmak açısından yetersiz olan laboratuvarların birçoğu ticari tanımlama sistemlerine başvurmaktadır. Ancak, ticari sistemlerin "doğrulukları" çeşitli karşılaştırmalı çalışmalarda değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmada Candida türlerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *2015 Haziran - 2016 Haziran tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda tür düzeyinde tanımlanan 276 Candida cinsi mayanın dağılımları incelenmiş, bir yıllık dağılımı doğru temsil edecek şekilde tabakalı örnekleme yöntemine göre 72 köken seçilmiştir. Klasik tanımlama yöntemleri olan mısır unu-tween 80 agarda morfoloji ve ID32C maya tanımlama yöntemine ek olarak MALDI-TOF yöntemi sonuçları karşılaştırılmıştır. Kökenlerin 27'si için altın standart yöntem olarak rRNA gen bölgesi ITS genleri dizi analizi ve Phoenix™ yöntemi uygulanarak ikinci bir karşılaştırma yapılmıştır.*

Bulgular: *Tür tanımlamasında altın standart yöntem olarak ID32C yöntemi kabul edildiğinde, 41 kökenin (%56) her üç yöntemle de doğru olarak tanımlandığı görülmüştür. Kalan 31 kökenin ise (%44) en az bir yöntem ile hatalı tanımlandığı anlaşılmıştır. Dizi analizi ve Phoenix™ ile yeniden tanımlanan 27 kökenden 14 tanesinin (%52) Phoenix™ sistemi ile, 16 tanesinin (%59) mısır unu-tween 80 agarda morfoloji yöntemi ile, 22 tanesinin (%81) MALDI-TOF ile, 21 tanesinin (%78) ID32C yöntemi ile doğru tanımlandığı hesaplanmıştır.*

Sonuç: *Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında MALDI-TOF yönteminin hızlı ve güvenilir sonuç verdiği, maliyeti göz önüne alındığında ise, Candida cinsi mayaların tür düzeyinde tanınmasında en güvenilir yöntemin karbonhidrat asimilasyonuna dayalı ID32C yöntemi olduğu, diğer tanımlama yöntemlerinin ise %52 ve %59 doğrulukta tanımlama yapabildiği hesaplanmıştır.*

Anahtar kelimeler: *Candida, ID32C, dizi analizi, MALDI-TOF, mısır unu-tween 80 agar, Phoenix™, tür tanımı*

ABSTRACT

Comparative Analysis of Different Methods Used for the Identification of Candida on Species Level

Objective: *Since it changes treatment alternatives, identification of Candida yeast which is the most frequent infectious agent in human beingson species level. Many laboratories deficient in the use of classical diagnostic methods resort to commercially available automated identification methods. But, diagnostic "accuracy" of commercial identification systems have demonstrated variable results in various comparative studies. The aim of the present work is to compare different identification methods used for Candida species.*

Material and Methods: *Distribution of 276 Candida species was analyzed in Gazi University Hospital Microbiology Laboratory during the period between June 2015 and June 2016, and 72 isolates of Candida spp. were selected according to 'stratified random sampling' analysis method so as to accurately represent distribution related to this one year period Candida species Identification results obtained from morphological evaluation on corn meal-tween 80 agar as a conventional method and ID32C yeast identification system in addition to MALDI-TOF identification patterns were compared. A second comparative analysis was performed for 27 isolates in 72 selected samples using rRNA region ITS gene sequencing and Phoenix™ system.*

Results: *When ID32C method was considered as the gold standard in species identification in this study, a total of 41 isolates (56%) were identifed accurately by all three methods. The remaining 31 isolates (44%) were misidentified by at least one of the three methods. Among 27 isolates that were reidentified by DNA sequencing method, PhoenixTM identification system (n=14: 52%), morphology on corn meal-tween 80 agar (n=16: 59%), MALDI-TOF (n=22: 81%), and ID32C identification method (n=21: 78%) accurately identified indicated number of Candida isolates.*

Conclusion: *Among the techniques analysed, we estimated that the MALDI-TOF system presents valuable and fast results; however if we consider the costs of the methods, the most reliable method is ID32C method based on carbohydrate assimilation in identifying Candida species. Other methods presented accuracy between 52% and 79%.*

Keywords: *Candida, ID32C, DNA sequencing, MALDI-TOF, corn meal-tween 80 agar, Phoenix™, species identification*

Alındığı tarih: 08.04.2017
Kabul tarihi: 02.06.2017
Yazışma adresi: Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dekanlık binası 2. Kat Beşevler 06500 Ankara
e-posta: kalkanci@gazi.edu.tr
[§] Bu çalışma 16-20 Kasım 2016 tarihleri arasında Antalya'da düzenlenen 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mantarların cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmesi için deneyim gerektiren klasik mikolojik yöntemler kullanılmaktadır[1,2]. Küf mantarlarının tanımlanmaları için başlı başına bir yetkinlik gerektiren morfolojik değerlendirme zorunlu iken, mayalar ticari sistemler kullanılarak tanımlanabilir[3-5]. Klasik mikolojik yöntemler uzun sürebilir ve teknik olarak zordur. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarından, rutin örneklerin en hızlı şekilde işlenmesi ve en doğru sonucun iletilmesi beklenmektedir. Bu nedenle, günümüzde hastalık etkeni mayaların cins veya tür düzeyinde tanımlanmalarını gerçekleştiren çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir. Bazı ticari sistemler antifungal duyarlılık testi de yapabilmektedir[6].

İnsanlarda en sık hastalık etkeni olan mayalar *Candida* cinsi mayalardır. *Candida albicans* en sık izole edilen türdür. *C. albicans* tanısında en yaygın kullanılan klasik yöntem çimlenme borusu testi ve mısır unu-tween 80 agarda klamidospor oluşturma özelliğidir[2]. Laboratuvarlar *C. albicans* türünü kolaylıkla tanımlamaktadır. Laboratuvarlarda *C. albicans* dışındaki türlerin tanımlanması için klasik olarak mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri kullanılabilir. Ancak, bütün *Candida* türlerinin tanımlayıcı özellikleri bulunmaması tanıda zorluk oluşturmaktadır. *Candida* dışındaki *Trichosporon* gibi mayalar ise tanımlayıcı morfolojik özellikleri çok belirgin olmasına karşın, deneyimsizlik nedeniyle tanımlanamadan kalabilmektedir[7]. Cins ve tür düzeyinde tedavi seçenekleri değiştiğinden, mantarların tanımlanmaları büyük önem taşımaktadır. Klasik tanı yöntemlerini kullanmak açısından yetersiz olan laboratuvarların birçoğu ticari tanımlama sistemlerine başvurmaktadır. Ancak, ticari sistemlerin "doğruluklarının" çeşitli karşılaştırmalı çalışmalarda değişkenlik göstermiştir[8-11].

Bu çalışmada, çeşitli *Candida* kökenlerinin tür tanımlamalarında sıklıkla kullanılan farklı yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Mikrobiyoloji rutin laboratuvarımızda kullanmakta olduğumuz maya tanımlama yöntemlerinden mısır unu-tween 80 agarda morfoloji ve karbonhidrat asimilasyonu esasına dayalı ID32C (bioMérieux, Fransa) maya tanımlama sistemi sonuçları, "Matrix-assisted laser desorption/ionization" (MALDI-TOF) tanımlaması sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Örneklerin bir bölümü için ITS bölgesi dizi analizine göre yapılan kesin tür tanımlama sonuçları, mantarların tür düzeyinde tanımlanmaları için rutin olarak kullanmadığımız, ancak bakteri tanımlanmasında bir dönem kullanmış olduğumuz "Becton Dickinson Phoenix™ Automated Microbiology System" kullanılarak yinelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin seçilmesi

2015 Haziran - 2016 Haziran tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen kan, idrar, endotrakeal aspirat ve yara örneklerinden izole edilen 276 *Candida* cinsi mayanın tür tanımlama sonuçlarına göre dağılımları incelenmiştir. Tür tanımlaması için çimlenme borusu oluşturma, mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri ve karbonhidrat asimilasyonu temelli ID32C® (bioMérieux, Fransa) yöntemleri kullanılmıştır. Örneklerin bir yıllık tür dağılımı %50 *C. albicans*, %17 *Candida glabrata*, %8 *Candida tropicalis*, %5 *Candida krusei*, %4 *Candida kefyr,* %2 *Candida parapsilosis*, %2 *Candida sake* ve %12 diğer türler şeklindedir. Çalışmamızda, bu sıklıkları temsil edecek şekilde 72 izolat tabakalı örnekleme yöntemi ile seçilmiştir. Tür dağılımı için benzer oranlar gözetilmiştir. Örneklerin 35 tanesi *C. albicans*, 12 tanesi *C. glabrata*, 6 tanesi *C. tropicalis*, 4 tanesi *C. krusei*, 3 tanesi *C. kefyr*, 2 tanesi *Candida guilliermondii*,

2 tanesi *C. parapsilosis,* 2 tanesi *C. sake*, 2 tanesi *Schwanniomyces etchellsii/Priceomyces carsonii* (Mısır unu ile *Candida*), birer tanesi ise *Candida dubliniensis, Candida lusitaniae, Candida norvegensis, Candida sphaerica* olarak seçilmiştir. Seçilen örnekler önceki tanımlamalardan bağımsız ve "kör" olarak mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri ve karbonhidrat asimilasyonu temelli ID32C® yöntemleri ile yeniden tanımlanmıştır. Bu örneklere ayrıca MALDI-TOFF yöntemi uygulanmıştır. Böylece 72 izolat için mısır unu ve ID32C® yöntemleri ile MALDI-TOF yöntemi sonuçları karşılaştırılmıştır. Grubun içinden 27 örnek için bu üç yönteme ek olarak, DNA dizi analizi yöntemi ve Phoenix™ otomatik mikrobiyoloji tanımlama sistemleri ile ikinci bir tanımlama yapılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır.

Mısır unu-tween 80 agarda morfolojinin değerlendirilmesi

Mısır unu besiyeri (Oxoid, Thermo Scientific, Birleşik Krallık) ticari olarak satın alınmış, üretici firma önerilerine uygun olarak 17 g toz 1 lt distile su içinde çözülmüş ve bir süre kaynatılarak süspansiyon hâline getirilmiştir. Karışım 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır. Besiyeri sıcaklığı 50°C civarına gelince, %1 oranında steril tween 80 eklenmiştir. Steril plaklara dökülerek hazırlanmıştır. Her bir köken bu besiyerine çizgi şeklinde ekilmiş, 48-72 saat süre ile oda ısısında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda besiyerleri 10x'luk ve 40x'lık büyütmede incelenmiştir[2].

Karbonhidrat asimilasyonuna dayalı maya tanımlama sistemi

API ID 32C (bioMérieux, Fransa), kısaca ID32C sistemi kullanılmıştır. Toz hâline getirilmiş karbonhidrat içeren kuyucukların bulunduğu plastik plakada her bir kuyucuk üzerine 135 μl besiyeri ve inokülum eklenmiştir. Plakalar 24 saat, gerekirse 48 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreme olan ve olmayan kuyucuklardan elde edilen sekiz basamaklı kodun "web" sayfası üzerinden karşılığı okunmuştur.

Phoenix™ otomatik mikrobiyoloji tanımlama sistemi

Phoenix™ Automated Microbiology System Yeast ID Panel (BD Biosciences, Sparks, MD, ABD) üretici firma önerilerine uygun olarak kullanılmıştır. Standardize edilmiş inokülum "Phoenix AST Broth" içinde hazırlanmıştır. Bir damla "Phoenix AST Indicator" eklenmiştir. Son konsantrasyon $5x10^5$ CFU/ml olarak düzenlenmiştir. İnokülum Phoenix paneline eklenmiş ve panel Phoenix cihazına yüklenmiştir. Sonuçlar 16-24 saat sonunda değerlendirilmiştir.

DNA dizi analizi

Sabouraud dekstroz agarda üremiş *Candida* kolonilerinin genomik DNA'ları proteinaz K içeren bir sıvı içinde 65°C'de iki saat süre ile sindirilerek, ardından fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi ile temizlenmiştir. DNA'lar nano spektrofotometrede ölçülmüştür (Nanodrop, ABD). Fungal rDNA'nın 5.8S bölümdeki ITS geninin çoğaltılması için ITS1 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAAGTA-3' ve ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer) kullanılarak boyandıktan sonra, ddNTP ile işaretli örneklere ABI PrismTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında kapiller elektroforez uygulanmıştır. Hem ITS1 hem de ITS4 primerleri ile iki kez dizileme yapılmıştır. Elde edilen DNA dizileri "National Center for Biotechnology Information" BLAST sistemi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) kullanılarak tanımlanmıştır.

MALDI-TOF

Tanımlama MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) cihazı ile yapılmıştır. Mayaların tür düzeyinde tanımlanması üretici firmanın önerdiği işlemler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. MALDI Biotyper skoru ≥2 olanlar güvenli tanımlama sınırları içinde, skoru ≥1.7 ve <2.0 olası tanımlama sınırları içinde değerlendirilmiştir. Çalışılan tüm mayaların skoru ≥2 olarak belirlenmiştir.

Yöntemlerin karşılaştırılması

Çalışmada, 72 örneğin tanımlanmasında altın standard yöntem olarak ID32C yöntemi, 27 örneğin tanımlanmasında altın standart yöntem olarak DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Altın standard yöntemin sonucu "doğru" kabul edilerek, her bir türün tanımlanması için ayrı ayrı olmak üzere, her bir testin doğruluğu ve yanlışlığı hesaplanmıştır.

BULGULAR

Çalışma için seçilen 72 örneğin tür düzeyinde tanımlanmasında mısır unu-tween 80 agarda morfolojik özellikleri, ID32C maya tanımlama sistemi sonuçları ve MALDI-TOF sonuçları karşılaştırılmıştır. Bütün tanımlama sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Koyu renkli satırlar doğru tanımlanan 41 örneği içermektedir. Renksiz satırlar herhangi bir yöntem ile hatalı tanımlanan 31 örneği içermektedir.

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan karbonhidrat asimilasyonuna dayalı ID32C sistemi altın standart yöntem olarak kabul edildiğinde, 72 izolatın 41 tanesinde (%56) her üç yöntem ile aynı ve doğru sonuç alındığı görülmüştür. Tür düzeyinde bakıldığında, 35 *C. albicans* kökeninden 35'i de mısır unu-tween 80 agar ile doğru tanımlanırken, MALDI-TOF ile 24 tanesi *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. On iki *C. glabrata* kökeni de mısır unu-tween 80 ile doğru tanımlanmış, MALDI-TOF ile 10 tanesi *C. glabrata* olarak tanımlanmıştır. Daha iyi anlaşılması açısından bu karşılaştırma bir tablo hâline getirilmiş ve Tablo 2'de sunulmuştur. MALDI-TOF veya mısır unu-tween 80 agardaki morfolojilerine göre yanlış tanımlanan 31 kökenin (72 izolatın %44'ü) 11 tanesi hem ID32C ile hem de mısır unu-tween 80 agar ile *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF bu 11 kökeni albicans dışı kökenler olarak isimlendirmiştir. MALDI-TOF veya mısır unu ile doğru tanımlanmayan diğer 20 örnek ise ID32C ile albicans dışı türler olarak tanımlanan kökenlerdir. Seçilmiş 72 izolat için mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri, ID32C maya tanımlama sistemi sonuçları ve MALDI-TOF tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında MALDI-TOF yönteminin, mısır unu-tween 80 agarda morfolojik tanımlamadan daha yetersiz kaldığı değerlendirilmiştir.

Çalışmada, seçilen 72 *Candida* kökeninin 27 tanesine ayrıca dizi analizi ve Phoenix otomatik sistemleri ile ikinci bir değerlendirme uygulanmıştır. Bu 27 köken için altın standart yöntem olarak rRNA gen bölgesi ITS dizi analizi yöntemi kabul edilmiştir. Buna göre, yapılan doğruluk hesaplamasında, mısır unu-tween 80 agar ile 16 örnek (%59), Phoenix ile 14 örnek (%52), ID32C sistemi ile 21 örnek (%78), MALDI-TOF ile 22 örnek dizi analizi ile (%81) aynı tür tanımını vermiştir. Tablo 3'te altın standard yöntem olarak dizi analizi kabul edildiğinde, her beş tanımlama yönteminin doğruluk oranları sunulmaktadır. Bu 27 örnek için dizi analizinden sonra en güvenilir tanımlama yönteminin MALDI-TOF sistemi olduğu, bunu ID32C sisteminin izlediği anlaşılmıştır.

Karşılaştırılan beş tanımlama yönteminin test başına maliyet analizleri hesaplanmıştır. Tablo 4'te bu maliyetler ve tanımlama süreleri sunulmaktadır.

Tablo 1. Toplam 72 örneğin tür düzeyinde tanımlama sonuçları. Koyu renkli satırlar ID32C, MALDI-TOF ve mısır unu-tween 80 agarda morfoloji sonuçlarına göre aynı tür olarak tanımlanan 41 örneği göstermektedir. Açık renkli satırlarda gösterilen 31 örnek herhangi bir yöntem ile farklı tanımlanmıştır.

Mısır Unu Yöntemi	Phoenix Cihazı	IDC 32 Yöntemi	MALDI-TOF	DNA dizi analizi
Candida glabrata	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
Candida tropicalis	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
Tanımlanamayan	*Pichia burtonii*	*Candida kefyr*	*Kluyveromyces marxianus*	*Candida kefyr*
Candida tropicalis	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
Candida albicans	*Candida melibiosica*	*Candida albicans*	*Candida dubliniensis*	*Candida dubliniensis*
Candida glabrata	*Candida firmetaria*	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
Candida sp.	Unidentified Organism	*Candida kefyr*	*Kluyveromyces marxianus*	*Candida kefyr*
Candida glabrata	Unidentified Organism	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
Candida tropicalis	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	*Candida glabrata*	*Candida tropicalis*
Candida glabrata	*Candida tropicalis*	*Candida glabrata*	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
Candida glabrata	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
Candida sp.	Unidentified Organism	*Candida norvegensis*	*Candida inconspicua*	*Candida inconspicua*
Candida krusei	*Candida krusei*	*Candida krusei*	*Issatchenkia orientalis*	*Candida krusei*
Candida krusei	Unidentified Organism	*Candida krusei*	*Candida inconspicua*	*Candida krusei*
Candida krusei	*Candida kefyr*	*Candida krusei*	*Issatchenkia orientalis*	*Candida krusei*
Candida krusei	*Candida krusei*	*Candida krusei*	*Issatchenkia orientalis*	*Candida krusei*
Candida dubliniensis	*Candida glabrata*	*Candida dubliniensis*	*Candida glabrata*	*Candida dubliniensis*
Candida guilliermondii	*Candida tropicalis*	*Candida guilliermondii*	*Candida tropicalis*	*Candida guilliermondii*
Candida kefyr	Unidentified Organism	*Candida kefyr*	*Kluyveromyces marxianus*	*Candida kefyr*
Candida sp.	*Candida parapsilosis*	*Candida sake*	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
Candida sp.	*Candida parapsilosis*	*Candida sake*	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
Candida sp.	*Candida parapsilosis*	*Schwanniomyces etchellsii / Priceomyces carsonii*	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
Candida guilliermondii	*Candida guilliermondii*	*Candida guilliermondii*	*Meyerozyma guilliermondii*	*Candida guilliermondii*
Candida sp.	*Candida parapsilosis*	*Schwanniomyces etchellsii / Priceomyces carsonii*	*Candida orthopsilosis*	*Candida orthopsilosis*
Candida parapsilosis	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
Candida sp.	*Candida lusitaniae*	*Candida lusitaniae*	*Clavispora lusitaniae*	*Candida lusitaniae*
Candida sp.	*Candida kefyr*	*Candida sphaerica*	*Kluyveromyces marxianus*	*Candida sphaerica*
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida tropicalis*	
Candida glabrata		*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida glabrata		*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Issatchenkia orientalis*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida dubliniensis*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida glabrata*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Kluyveromyces marxianus*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida glabrata*	
Candida tropicalis		*Candida tropicalis*	*Candida parapsilosis*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	
Candida albicans		*Candida albicans*	*Candida albicans*	

TARTIŞMA

Tıpta bilimsel ölçümler yapılmasının nedeni tanıya yardımcı olmaktır. Geleneksel olarak testlerin karşılaştırılmasında kullanılan göstergeler duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerdir. Ancak bu çalışmada, bu değerlerin hesaplanmasında gerekli olan "yalancı pozitiflik" ve "yalancı negatiflik" oranları bulunmamaktadır[12]. Bu çalışmada, altın standard bir yöntem ile diğer yöntemler karşılaştırılmıştır. Bu nedenle testler bir *Candida* türünün

Tablo 2. ID32C altın standart yöntem kabul edildiğinde mısır unu-tween 80 agarda morfoloji ve MALDI-TOF yöntemlerinin doğrulukları.

		Doğru tanımlanan örnek sayısı (%)*	
	ID32 C (Altın Standart yöntem)	Mısır unu-tween 80	MALDI-TOF
C. albicans	35	35/35 (% 100)	24/35 (% 69)
C. glabrata	12	12/12 (% 100)	10/12 (% 83)
C. tropicalis	6	5/6 (% 83)	4/6 (% 67)
C. krusei	4	4/4	3/4 *(Issatchenkia orientalis)*
C. kefyr	3	1/3	3 *(Kluvyeromyces marxianus)*
C. guilliermondii	2	2/2	1/2 *(Meyerozyma guiliermondii)*
C. parapsilosis	2	1/2	2/2
C. sake	2	0/2	0/2
Schwanniomycesetchellsii / Priceomycescarsonii	2	1/2	0/2
C. dubliniensis	1	0/1	0/1
C. norvegensis	1	0/1	0/1
C. lusitaniae	1	0/1	1 *(Clavisporal usitaniae)*
C. sphaerica	1	0/1	0/1
TOPLAM	72	61/72 (% 85)	48/72 (% 68)

**: Örnek sayısı yüzde hesaplamaya uygun bulunmadığından 4 ve altındaki gruplarda yüzde hesaplanmamıştır.*

Tablo 3. DNA dizi analizi altın standart yöntem kabul edildiğinde mısır unu-tween 80 agarda morfoloji, Phoenix™, ID32C ve MALDI-TOF yöntemlerinin doğrulukları.

	DNA dizi analizi (Altın Standart yöntem)	Mısır unu-tw80	Phoenix™	ID32C	MALDI-TOF
C. parapsilosis	5	1/5	5/5	2/5	5/5
C. glabrata	4	4/4	3/4	4/4	4/4
C. krusei / Issatchenkia orientalis	4	4/4	2/4	4/4	3/4 (*I. orientalis*)
C. tropicalis	3	2/3	3/3	2/3	2/3
C. kefyr / Kluvyeromyces marxianus	3	2/3	0/3	3/3	3/3 *(K. marxianus)*
C. guilliermondii / Meyerozyma guiliermondii	2	2/2	1/2	2/2	1/2 *(M. guiliermondii)*
C. dubliniensis	2	1/2	0/2	1/2	1/2
C. inconspicua	1	0/1	0/1	0/1	1/1
C. orthopsilosis	1	0/1	0/1	0/1	1/1
C. lusitaniae	1	0/1	1/1	1/1	1/1
C. sphaerica	1	0/1	0/1	1/1	0/1
TOPLAM	27	16/27 (% 59)	14/27 (% 52)	21/27 (% 78)	22/27 (% 81)

**: Örnek sayısı yüzde hesaplamaya uygun bulunmadığından gruplarda yüzde hesaplanmamıştır.*

Tablo 4. Test başına maliyet ve tanımlama süreleri.

Yöntem	Test Başı Maliyet (Cihaz hariç)	Tanımlama Süresi
Mısır unu – tween 80 agar	0.3 TL	48-72 saat
ID32C	25 TL	24-48 saat
Phoenix™	24 TL	16-18 saat
DNA dizi analizi	50 TL	12 saat
MALDI-TOF	6 TL	3 dakika

tanımlanmasında "doğruluk" ölçütünde karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Candida* cinsi mayaların tanımlanmasında kullanılan karbonhidrat asimilasyonu prensibine dayalı ID32C maya tanımlama sistemi sonuçları altın standart kabul edilerek karşılaştırmalı bir analiz yapılmıştır. 2016 yılında yayımlanan Koneman'ın Mikrobiyoloji kitabının mikoloji bölümünde *Candida* cinsinin tanımlanmasında mısır unu-tween 80 agardaki morfolojinin yeterli olamayacağı ve birçok tür için

belirgin özelliklerin bulunmadığı belirtilmiştir[2]. Bu nedenle bazı türler için morfolojik değerlendirme altın standart yöntem olarak kabul edilmemelidir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında morfolojik özelliklerin değerlendirilebilmesi için gerekli olan deneyimli personel eksiği nedeniyle biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Bu testlerin karşılaştırıldığı çok merkezli bir çalışmada, Vitek ve API 20C AUX sonuçları değerlendirilmiştir[13]. Toplam 473 izolatın değerlendirildiği çalışmada, *Candida* cinsi dışındaki türler de bulunmaktadır. *C. albicans* tanımlanmasında genel olarak sorun yaşanmamıştır. En çok *C. parapsilosis* yanlış tanımlanmıştır. Altın standard yöntem olarak morfolojik özelliklerin kabul edildiği bu çalışmada elde edilen sonuçların dikkatle analizi gerekir. Mısır unu morfolojisine göre *C. parapsilosis* olarak tanımlanan örnekler biyokimyasal olarak *Candida famata* olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlardan hangisinin doğru olduğu tartışılmalıdır.

Çalışmamızda olduğu gibi karbonhidrat asimilasyonu altın standart tanımlama yöntemi olarak kabul edildiğinde, MALDI-TOF ve/veya mısır unu-tween 80 agar morfolojisinin 31 köken için (%44) hatalı tanımlama yaptırdığı anlaşılmıştır. Bu kökenlerin 11 tanesi, hem ID32C ile hem de mısır unu-tween 80 agar ile *C. albicans* olarak tanımlanmış, fakat MALDI-TOF ile bu kökenler albicans dışında türler olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF ilginç bir şekilde *C. albicans* tanımlamasında %69 oranında doğru sonuç verebilmiştir. Beş yöntemin karşılaştırıldığı ve dizi analizinin altın standard kabul edildiği 27 kökenlik ikinci analizde ise MALDI-TOF'un doğru tanımlama yüzdesi yüksek bulunmuştur (%81). İki analiz arasındaki bu farkın nedeni *C. albicans* türünün ikinci analiz grubunda bulunmamasıdır. MALDI-TOF'un *C. albicans* türünün tanımlanmasında ID32C ile karşılaştırıldığında %31 oranında hata yapmış olması ilginçtir. Bu kökenlerin tamamı mısır unu-tween 80 agarda klamidospor oluşturmuştur. Bu nedenle ID32C'in *C. albicans* olan tür tanımı doğrulanmıştır. Bu çalışmanın en dikkat çekici sonuçlarından biri *C. albicans* için MALDI-TOF ile elde edilen bu düşük tanımlama oranlarıdır. Bu sonuçlarımızı doğrulayacak bir başka çalışmaya rastlanmamıştır.

Tanımlamalar içinde bir adet *C. dubliniensis* bulunmaktadır. Bu tür mısır unu-tween 80 agarda tipik klamidosporlar oluşturmamıştır. ID32C de bu kökeni *C. albicans* olarak isimlendirmiştir. Tek köken olduğu için başka analiz yapılamamakla birlikte, *C. dubliniensis* tür tanımlamasının rutin laboratuvarlarda sorun oluşturduğu bir kere daha kanıtlanmıştır.

ID32C ve mısır ununda *C. kefyr* olarak tanımlanan 3 köken de, MALDI-TOF ile *Kluvyeromyces marxianus* olarak isimlendirilmiştir. *K. marxianus, C. kefyr*'in eşeyli (telemorf) ismidir. İnsan enfeksiyonlarında eşeyli form etken olamaz. MALDI-TOF sisteminde bilgi bankasının eşeyli form ile oluşturulmuş olduğu anlaşılmaktadır. Aslında bu bir hatalı tanımlama değildir. Kütüphane oluşturulur iken, eşeyli formun ismi kullanıldığı için benzer proteomiks profili bu tanımı vermektedir. Klinik anlamı olan *C. kefyr* türü ile bilgi kaydının düzeltilmesi uygun olacaktır. MALDI-TOF sistemi bilgi bankasında bulunan bütün tür kayıtlarının eşeysiz isimleri içerecek şekilde güncellenmesi gerekmektedir. Benzer bir uygunsuzluk *C. krusei - Issatchenkia orientalis* tanımlaması için de geçerlidir. MALDI-TOF *C. guilliermondii* yerine *Meyerozyma guilliermondii* tanımını, *C. lusitaniae* yerine *Clavispora lusitaniae* tanımını vermiştir. Bunlar aynı türdür. Buna benzer terminolojik karışıklıklar zaman zaman gen bankası kayıtlarında da görülmektedir. Tedavi düzenlenmesinde tür tanımı kullanılmaktadır. Sistem bilgi kayıtlarında sürekli güncellemeler yapılamaz ise, rutin tanımlama sonuçları verilmeden önce klinisyen için alışılmış isimler kullanılarak düzeltilmesi bu sorunları ortadan kal-

dırabilir. Burada mikrobiyoloji laboratuvarından tanımlama sonucu çıkarılmadan önce taksonomik bilgi eşliğinde gözden geçirilmesi gerektiği bir kez daha vurgulanmalıdır. Yüksek teknolojik yöntemler kullanıldıkça, farklı türler karşımıza çıkmaya devam edecektir.

Toplam 124 *Candida* kökeninin değerlendirildiği Polonya merkezli bir çalışmada, ID32C, Vitek 2 YST sonuçları iki ayrı MALDI-TOF ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda ID32C yönteminin MALDI-TOF ile uyumu %98.4, Vitek 2 YST sisteminin %100 bulunmuştur. Bu çalışmada iki kütle spektrometresinden, bizim de çalışmamızda kullandığımız, Bruker sistemi, Vitek sisteminden bir miktar üstün bulunmuştur. Her iki MALDI-TOF cihazı da genel olarak ID32C ve Vitek 2YST tanımlama sistemlerine uyumlu sonuç vermiştir[14].

Ülkemizde de MALDI-TOF kullanımı yaygınlaşmakta ve son yıllarda bu konuda yapılan yayın sayısı artmaktadır. Özcan ve ark. [15], 297 *Candida* kökenini tür düzeyinde tanımlamak için çimlenme borusu oluşturma ve MALDI-TOF sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar kökenlerin tamamını tür düzeyinde tanımlamışlar, ancak bu sonuçları bir başka tanımlama yöntemi ile karşılaştırmamışlardır. Bu nedenle sonuçları sonuçlarımız ile karşılaştırılamamıştır.

Fatania ve ark.[16] standart biyokimyasal tanımlama (SBT) olarak API 20C AUX yöntemini, MALDI-TOF ile karşılaştırmışlardır. Çoğunluğu *Candida* cinsine ait toplam 200 maya kökeninden 182 tanesinin (%91) SBT ve MALDI-TOF ile aynı tür olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Uyumsuz sonuç veren 18 örnekten 3 tanesine bir başka merkez MALDI-TOF yöntemini uygulamış ve aynı tanımlama sonucunu verdiği için dizi analizine gönderilmemiştir. Kalan 15 örneğe dizi analizi uygulanmıştır. MALDI-TOF ile isimlendirilemeyen 8, SBT ile isimlendirilemeyen 4 örnek dizi analizi ile tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar MALDI-TOF sistemini rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için güvenilir bulmuş, gerektiğinde bir başka doğrulama yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Kim ve ark.[17] 2016 yılında yaptıkları çalışmada, Vitek 2 sistemi ile *C. famata* (38 adet), *C. lusitaniae* (12 adet), *Meyerozyma guilliermondii* (5 adet, *Candida guilliermondii*) olarak tanımlanan toplam 55 kökeni, BD Phoenix sistemi, Vitek MALDI-TOF sistemi ve DNA dizi analizi yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışma, tasarımı bakımından çalışma sonuçlarımız ile karşılaştırılabilecek en benzer çalışmadır. Köken sayıları da çalışmamıza yakındır. Vitek 2 ile *C. famata* olarak tanımlanan 38 köken dizi analizi ile 20 *C. tropicalis*, 7 *C. albicans*, 4 *C. parapsilosis*, 2 *M. guilliermondii*, 2 *Candida auris*, birer de *C. lusitaniae, C. krusei* ve *Pichia fabianii* olarak isimlendirilmiştir. Dizi analizi sonuçları esas alındığında, bu 38 kökenin 31 tanesi *Phoenix* ile doğru tanımlanmıştır. MALDI-TOF bu 38 örneğin 34 tanesini ITS dizi analizi ile aynı tür olarak tanımlamıştır. Toplam 55 köken için, Vitek MALDI-TOF ile doğru tanımlama yüzdesi %92,7 (51/55), Bruker MALDI-TOF %94.6 (52/55) olarak hesaplanmıştır. Kütle spektrometresi yöntemlerinin rutin laboratuvarlarda kullanılmasının dizi analizi sonuçlarına yakın güvenilirlikte sonuç vereceği, otomatize tanımlama sistemlerinin *C. albicans* dışındaki türlerin tanımlanmasında yetersiz kaldıkları bir kez daha gösterilmiştir.

Test maliyetleri rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yöntem seçiminde büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda düzenlenen geri ödeme kuralları gereğince, Sağlık Uygulama Tebliği fiyatları uygulanmaktadır. Test başına maliyet hesabı yapılarak testin güvenilirliği yanında, maliyetinin de uygun olması beklenmektedir. Çalışmamızda değerlendirilen beş yöntemin süre ve maliyet açısından karşılaştırması yapılmıştır. En ucuz yöntem olan mısır unu-tween 80 agar mor-

folojisine dayalı tanımlama genellikle 48 saat bazen, 72 saat sürebilmekte ve deneyimli personel gerektirmektedir. MALDI-TOF yöntemi cihaz fiyatı hariç tutulduğunda sarf malzemesi gerektirmeyen, ucuz bir yöntemdir. Üstelik dakikalar içinde sonuç alınmaktadır. Ancak, cihazın yüksek maliyeti önemli bir engelleyici unsurdur. Örnek sayısı yüksek olan laboratuvarlarda, test karşılığı firma tarafından temin edilmesi koşuluyla, kullanımı yaygınlaşabilir. Biyokimyasal yöntemler olan ID32C ve Phoenix sistemlerinin maliyeti birbirine yakındır. Çalışma süresi de benzerdir. Phoenix sistemi ile genellikle 16 saat içinde sonuç alınmaktadır. En güvenilir yöntem olarak bilinen ancak yüksek maliyeti nedeniyle rutin laboratuvarlar için uygulaması zor olan dizi analizi yöntemi ise aynı gün içinde sonuç verebilmektedir. Maliyet analizine dayalı bir seçim yapılmak istendiğinde, her laboratuvarın kendi koşullarını ve test sayılarını düşünerek karar vermesi gerekecektir.

Kökenlerin tamamına dizi analizi uygulanamamıştır. Çalışmamızın en önemli eksiği budur. Başlangıçta planlanmış olmasına rağmen, maliyet ve teknik nedenler nedeniyle sonuçlandırılamamıştır. Yalnızca 27 örnek için altın standart yöntem olarak rRNA gen bölgesi ITS genleri dizi analizi uygulanarak ikinci bir karşılaştırma yapılabilmiştir. Dizi analizi ile karşılaştırıldığında en güvenilir sonuç veren yöntemin MALDI-TOF olduğu görülmüştür. *C. albicans* dışındaki türlere ait 27 kökenden 21 tanesinin (%78) ID32C yöntemi ile doğru tanımlandığı belirlenmiştir. MALDI-TOF ile dizi analizi arasındaki uyum %81 ile en yüksek değerdir. Diğer iki yöntem olan mısır unu-tween 80 agar morfolojisi ve Phoenix sistemleri %59 ile %52 oranında doğru tanımlama yapabilmiştir. Bu oranların hesaplanmasında 27 örnekten elde edilen sonuçlar kullanıldığı için, güvenilirlikleri düşük olmakla birlikte, rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için genel bir değerlendirme sunmaktadır.

Wang ve ark.[18] Çin genelinde çok merkezli bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada 25 farklı tür içeren 2683 izolat değerlendirilmiştir. Bu geniş çalışmada iki ayrı firmaya ait iki MALDI-TOF sistemine ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu iki cihazdan elde edilen uyumsuz tanımlama sonuçları için ITS dizi analizi yöntemi kullanılarak maliyet azaltılmaya çalışılmıştır. Araştırmacılar bu yaklaşımı "integre altın standart" yöntem olarak isimlendirmişlerdir. Çalışmamızda da, örneklerin tamamına benzer nedenler ile ITS dizi analizi uygulanamamıştır. Seçilmiş 27 örneğin sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmamızın zayıf yönü bu açıdan bakıldığında kabul edilebilir sınırlar içindedir. Karşılaştırmalı çalışmaların büyük bölümü sınırlı sayıda örnek içermektedir[5]. Üstelik değerlendirilen örneklerin genellikle yarısı aslında tür tanımında sorun yaşamadığımız *C. albicans* kökenlerini içermektedir[19]. Çalışmaların birbiri ile karşılaştırılmasını kısıtlayan en önemli faktör kökenlerin tür çeşitliliğinin sınırlı olması, *C. albicans* dışındaki köken sayısının yetersiz olması ve her çalışmada kullanılan yöntemin birbirinden çok farklı olmasıdır[20,21]. Mayaların tanımlanmasında sorunlar olması nedeniyle güvenilir ve hızlı olduğu kadar, ucuz da olan bir yöntemin arayışı sürmektedir[22,23].

Duyvejonck ve ark.[24] 347 örnek için MALDI-TOF yöntemini altın standart kabul ederek ITS bölgesinin dizi analizi sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılara göre, üreyen koloniden elde edilen DNA'nın dizilenmesinin düşük pozitif prediktif değere sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yerine klinik örnekten doğrudan DNA elde edilmesini önermişlerdir. Gerek koloniden ve gerekse klinik örnekten doğrudan yapılan DNA eldesi ve dizi analizi yönteminin bütün mikroorganizmaların tanımlanmasında altın standart olduğu tartışmasız olmakla birlikte, bu yöntemin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında günlük kullanımı olası değildir. Üstelik bazı teknik kısıtlılıkları da bulunmaktadır[25]. Bu nedenle

en az DNA kadar güvenilir olan "proteom" tanımlamasının kullanıldığı kütle spektrometresi yönteminin yaygınlaşmasının *Candida* cinsi içindeki tür tanımlamasında en doğru sonuçları sunacağı düşünülmektedir. Bu konuda ülkemizden yapılan bildirimlerin sayısı artmaktadır[26].

O zamana kadar çimlenme borusu oluşturma, mısır unu-tween 80 agarda morfolojik özelliklerin analiz edildiği klasik tanımlama yöntemine eşlik eden karbonhidrat asimilasyonuna dayalı biyokimyasal yöntemlerin kullanımına devam edilmeli, otomatize tanımlama sistemlerinden elde edilen tür tanımları mutlaka bir başka klasik yöntem ile doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Nerurkar V, Khan S, Kattungal S, Bhatia S.** Identifying *Candida* and other yeast-like fungi: utility of an identification algorithm in resource limited setting. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:DC01-4. https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9753.5259
2. **Procop GW, Koneman EW.** Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th Edition, Wolters&Kluwer, 2016.
3. **Çopur Çiçek A, Koç AN, ErtürkA, Demir G, Bahçeci İ.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *Abant Med J* 2104; 3:248-52.
4. **İnci M, Atalay MA, Koç AN, Özer B, Kılınç Ç, Durmaz S.** *Candida albicans* dışı mayaların tanımlanmasında VITEK 2 YST kart ile API 20C AUX sisteminin karşılaştırılması. *Dicle Tıp Derg* 2012; 39:80-2. https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2012.01.0099
5. **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.
6. **Kathuria S, Singh PK, Sharma C, et al.** Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J Clin Microbiol* 2015; 53:1823-30. https://doi.org/10.1128/JCM.00367-15
7. **Chao Q-T, Lee T-F, Teng S-H, et al.** Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PLoS One* 2014; 9:e109376. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109376
8. **Sow D, Fall B, Ndiaye M, et al.** Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. *Mycopathologia* 2015; 180:173-9. https://doi.org/10.1007/s11046-015-9905-2
9. **Feyzioğlu B, Doğan M, Özdemir M, Baykan M, Baysal B.** Kandida türlerinin tanımlanmasında Corn Meal Agar, *Candida* ID2 kromojenik besiyeri ve API 32 IDC performansının değerlendirilmesi. *Selçuk Tıp Derg* 2014; 30:43-5.
10. **Sav H, Demir G, Atalay MA, Koç AN.** Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2013; 70:175-80. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2013.37267
11. **Pravin Charles MV, Kali A, Joseph NM.** Performance of chromogenic media for *Candida* in rapid presumptive identification of *Candida* species from clinical materials. *Pharmacognosy Res* 2015; 7(Suppl 1):S69-73. https://doi.org/10.4103/0974-8490.150528
12. **Dirican A.** Tanı testi performanslarının değerlendirilmesi ve kıyaslanması. *Cerrahpaşa J Med* 2001; 32:25-30.
13. **Karabıçak N, Uludağ Altun H ve ark.** Mikrobiyoloji laboratuvarlarında maya türlerinin tanımlanmasında sık kullanılan ticari sistemlerin değerlendirilmesi: çok merkezli bir çalışma. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:210-20. https://doi.org/10.5578/mb.9370
14. **Stefaniuk E, Baraniak A, Fortuna M, Hryniewicz W.** Usefulness of CHROMagar *Candida* medium, biochemical methods - API ID32C and VITEK 2 compact and two MALDI-TOF MS systems for *Candida* spp. identification. *Pol J Microbiol* 2016; 65:111-4. https://doi.org/10.5604/17331331.1197283
15. **Özcan N, Ezin Ö, Akpolat N, Bozdağ H, Mete M, Gül K.** Klinik örneklerde saptanan *Candida* türlerinin MALDI-TOF MS ile tiplendirilmesi. *Dicle Tıp Derg* 2016; 43:390-4.
16. **Fatania N, Fraser M, Savage M, Hart J, Abdolrasouli A.** Comparative evaluation of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry and conventional phenotypic-based methods for identification of clinically important yeasts in a UK-based medical microbiology laboratory. *J Clin Pathol* 2015; 68:1040-2. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203029
17. **Kim TH, Kweon OJ, Kim HR, Lee MK.** Identification of uncommon *Candida* species using commercial identification systems. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26:2206-13. https://doi.org/10.4014/jmb.1609.09012
18. **Wang H, Fan YY, Kudinha T, et al.** A comprehensive evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry systems for identification of yeasts, part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1376-80. https://doi.org/10.1128/JCM.00162-16
19. **Gayibova Ü, Dalyan Cılo B, Ağca H, Ener B.** Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında Phoenix Yeast ID Panel ile API ID 32C ticari sistemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:438-48. https://doi.org/10.5578/mb.7827

20. **Zhao L, De Hoog S, Cornelissen A, et al.** Prospective evaluation of the chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of non-*Candida albicans Candida* species. *Fungal Biol* 2016; 120:173-8. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.006
21. **Kaçmaz B, Sipahi AB, Aksoy A.** *Candida* türlerinin tanımlanmasında "API ID32C" ve "RAPID YEAST PLUS" sistemlerinin karşılaştırılması. *ANKEM Derg* 2006; 20:214-6.
22. **Doğan Ö, İnkaya AÇ, Gülmez D, Uzun Ö, Akova M, Arıkan Akdağlı S.** PNA-FISH yönteminin kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin direkt tanımlanması ve antifungal tedavi planına olası etki yönünden değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:580-9. https://doi.org/10.5578/mb.27948
23. **Fraser M, Brown Z, Houldsworth M, Borman AM, Johnson EM.** Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Med Mycol* 2016; 54:80-8.
24. **Duyvejonck H, Cools P, Decruyenaere J, et al.** Validation of High Resolution Melting Analysis (HRM) of the amplified ITS2 region for the detection and identification of yeasts from clinical samples: comparison with culture and MALDI-TOF based identification. *PLoS One* 2015; 10:e0132149. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132149
25. **Khodadadi H, Karimi L, Jalalizand N, Adin H, Mirhendi H.** Utilization of size polymorphism in ITS1 and ITS2 regions for identification of pathogenic yeast species. *J Med Microbiol* 2017; 66:126-33. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000426
26. **Keçeli SA, Dündar D, Tamer GS.** Comparison of Vitek Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry versus conventional methods in *Candida* identification. *Mycopathologia* 2016; 181:67-73. https://doi.org/10.1007/s11046-015-9944-8

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):125-130, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.125

Araştırma

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* Suşlarının In-vitro Daptomisin ve Linezolid Duyarlılık Profilleri

Duygu ÖCAL, Oğuz Alp GÜRBÜZ, Zeynep DANSUK, Esra AKKAN KUZUCU, Enes ALTUNAY, Nalan APAYDIN, Gül ERDEM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

ÖZ

Amaç: *Sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların nedenleri arasında enterokok enfeksiyonları üst sıralarda yer almaktadır ve bu enfeksiyonların tedavisinde tüm dünyada giderek artan antibiyotik direnç sorunu ile karşılaşılmaktadır. Glikopeptidlere ve yüksek düzey aminoglikozidlere karşı direncin artması, linezolid ve daptomisin gibi, dirençli gram pozitif bakterilere karşı etkili antibiyotiklerin kullanımını da arttırmaktadır. Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen Enterococcus faecium ve Enterococcus faecalis suşlarında daptomisin ve linezolidin in vitro etkinliğinin saptanması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmaya Mayıs 2015-Ağustos 2016 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen 79 Enterococcus spp. izolatı dâhil edilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanılmıştır. Daptomisin duyarlılığı için sıvı mikrodilüsyon, linezolid için gradiyent test yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar daptomisin için CLSI 2016'ya göre, linezolid için ise EUCAST 2016'ya göre değerlendirilmiştir.*

Bulgular: *Kan kültürlerinden izole edilen enterokokların 24'ü (%30.4) E. faecium, 55'i (%69.6) E. faecalis olarak tanımlanmıştır. İzolatların tamamı daptomisin ve linezolide karşı duyarlı olarak saptanmıştır. Daptomisin MİK değerleri E. faecalis için 0.006-1 µg/ml, E. faecium için 0.125-2 µg/ml olarak saptanmıştır. Linezolid MİK değerleri ise E. faecalis için 0.25-2 µg/ml, E. faecium için 0.125-2 µg/ml olarak saptanmıştır.*

Sonuç: *Enterokok suşlarına karşı in vitro olarak etkili olan daptomisin ve linezolidin dirençli enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, daptomisin ve linezolide dirençli suş saptanmamasına rağmen, direnç gelişim olasılığına karşı mikrobiyoloji laboratuvarlarının dikkatli olması gerekmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Daptomisin, enterokok, linezolid*

ABSTRACT

In vitro Daptomycin and Linezolid Susceptibility Profiles of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis Strains Isolated from Blood Cultures

Objective: *Enterococcal infections are among the leading causes of health care-associated infections, and in the treatment of these infections gradually increasing rate of antimicrobial resistance issue is encountered all over theworld. Resistance to glycopeptides and high-level aminoglycosides also increases the use of antibiotics such as linezolid and daptomycin against resistant gram-positive bacteria. Detection of in vitro efficacies of daptomycin and linezolid against Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis strains isolated from blood cultures was aimed in this study*

Material and Methods: *Sevety-nine Enterococcus spp. isolated from blood cultures between May 2015-August 2016 were included in the study. Conventional methods and Phoenix automated system (Becton Dickinson, USA) were used in the identification of isolates. Broth microdilution was used to test for daptomycin susceptibility whereas gradient test was used to test linezolid susceptibility. Results were evaluated according to CLSI 2016 for daptomycin and EUCAST 2016 for linezolid.*

Results: *Twenty-four (30.4%) of the enterococci isolated from blood cultures were identified as E. faecium, and 55 (69.6%) as E. faecalis. All isolates were detected as susceptible to daptomycin and linezolid. Daptomycin MIC values were detected as 0.006-1 µg/ml for E. faecalis and 0.125-2 µg/ml for E. faecium. Linezolid MIC values were detected as 0.25-2 µg/ml for E. faecalis and 0.125-2 µg/ml for E. faecium.*

Conclusion: *Daptomycin and linezolid, as detected in vitro effective against Enterococci strains, are thought to be good alternatives in the treatment of resistant enterococcal infections. Although daptomycin and linezolid resistant strains were not detected in our study, microbiology laboratories should be careful about the possibility of development of resistance against these antibiotics.*

Keywords: *Daptomycin, enterococcus, linezolid*

Alındığı tarih: 24.02.2017
Kabul tarihi: 01.06.2017
Yazışma adresi: Duygu Öcal, Şehit Ömer Halisdemir Cad., Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara
Tel: 0312 596 26 71
e-posta: drduygunil@hotmail.com

GİRİŞ

Enterokoklar insan bağırsağı, ağız, vajina, üretra ve safra yollarında normal flora elemanı olarak bulunur, düşük virülansa sahip olmalarına rağmen, toplum ve sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda giderek artan sıklıkta etken olarak saptanmaya başlanmıştır[1,2]. Özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde bakteriyemi, menenjit, endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, neonatal sepsis, üriner sistem enfeksiyonları, intra-abdominal ve pelvik enfeksiyonlara neden olabilmektedirler[3].

Kan dolaşım enfeksiyonları ABD'de ölüm nedenleri arasında 10. sıradadır. Kan dolaşım enfeksiyon insidansı yoğun bakım hastalarında %1'den kemik iliği transplantı yapılmış hastalarda %36'ya kadar değişmektedir[4]. Gram pozitif bakteriler ile oluşan kan dolaşım enfeksiyonlarının %45'i enterokoklar ile ilişkilidir[5].

Enterokoklarda birçok antimikrobiyal ajana karşı doğal ve kazanılmış tipte direnç gözlenmesi bu bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlara yol açmaktadır. Penisilinler, sefalosporinler, klindamisin ve aminoglikozidler gibi antimikrobiyallere karşı gözlenen doğal direncin varlığı kombine antibiyotik tedavisini ya da farklı antimikrobiyal ajanların kullanımını zorunlu hâle getirmektedir[2].

Daptomisin; *Streptomyces roseosporus* tarafından üretilen doğal bir ürün olan siklik lipopeptid bir antibiyotiktir ve komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, *Staphylococcus aureus* bakteriyemisi ve sağ kalp enfektif endokarditi tedavisinde iyi bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır[6]. Gram pozitif aerop ve anaerop bakteri grupları üzerine hızlı bakterisidal etkinliğe sahiptir. Metisiline dirençli stafilokok türleri, glikopeptidlere orta duyarlı *S. aureus*, penisilin dirençli *Streptococcus pneumoniae* ve vankomisine dirençli enterokokları (VRE) da içine alan geniş çapta etkinliği vardır[7-10]. Daptomisin, oligorimerizasyon ile hücre zarı bütünlüğünü bozar, depolarizasyon sonucu sitoplazma zarı işlevini kaybeder ve hücre hızla ölür. Daptomisin hücre lizisine neden olmadığından, hücre duvarı ve hücre içi komponentlerinin salınımı olmamaktadır ve buna bağlı komplikasyon gelişme riski oluşturmamaktadır[11].

Linezolid protein sentezinde translasyonun başlamasını inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterir. 50S subunite bağlanır ve protein sentezinde ilk basamakta inhibisyon oluşturarak etki eder[12]. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'un neden olduğu komplike yumuşak doku enfeksiyonları ve nozokomiyal pnömoniler, penisiline dirençli *S. pneumoniae*'nin neden olduğu toplumdan kazanılmış pnömoniler ile buna eşlik eden bakteriyemiler ve VRE bakteriyemileri, linezolidin FDA onaylı olan kullanım endikasyonları arasında yer almaktadır[13].

Özellikle kan dolaşımı enfeksiyonlarında enterokokların direnç oranlarındaki artış tedavide sorunlar yaratmaktadır ve bu enfeksiyonlarda uygun antibiyotik seçimi daha da önem kazanmaktadır. Uygun ampirik tedavinin hasta prognozunu iyi yönde etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır[14,15].

VISA ve hetero-VISA'dan sonra glikopeptidlere tam dirençli izolatların da görülmeye başlanması nedeniyle vankomisin etkinliği korunmalıdır. Yükselmiş vankomisin MİK değerlerine sahip olan MRSA izolatlarında daptomisin kullanımının, vankomisin kullanımına avantajlı olduğu olgu kontrol çalışmaları ile gösterilmiştir[16].

Daptomisin, *Enterococcus faecium* veya vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*'in neden olduğu enfeksiyonlar için FDA tarafından onaylanmamış olsa da bakterisidal etkisi nedeniyle tercih edilebilir. Ayrıca enterokoksik endokarditte de kullanılabilir[17].

Linezolidin klinik bir avantajı oral formunun (biyoyararlanımının %100'e yaklaşan) olmasıdır. Bununla birlikte, miyelosupresyon ve özellikle trombositopeni, uzun süre kullanımından sonra ortaya çıkabilen ciddi bir komplikasyondur[18].

Hastanın durumu, klinisyenin seçimi, ampirik tedavi düşünüldüğünde, kullanılabilecek tüm antimikrobiyallerin duyarlılık sonucu önem kazanmaktadır. Ampirik tedavide klinisyenin seçimine yol gösterebilmek için kümülatif antibiyogram yapılmalı, özellikle klinisyenlerin sık seçtiği antimikrobiyallerin duyarlılık yüzdeleri takip edilmelidir. Bu çalışmanın amacı hastanemizde klinisyenlerin giderek sık kullanmaya başladığı daptomisin ve linezolidin kan kültürlerinden izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarına karşı in-vitro duyarlılığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi ve Tiplendirilmesi: Çalışmaya Sağlık Bakanlığı, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Mayıs 2015-Ağustos 2016 tarihleri arasında gönderilen kan kültürlerinden izole edilen 79 *Enterococcus* spp. izolatı dâhil edilmiştir. Laboratuvara gönderilen kan kültür şişeleri BACTEC FX 200 (Becton Dickinson, ABD) cihazında inkübasyona alınmıştır. Pozitif üreme sinyali veren şişelerden direkt Gram boyalı preparatlar hazırlanıp değerlendirildikten sonra kanlı agar ve Eosin Methylene Blue (EMB) agara pasaj yapılmıştır. 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra kültürler değerlendirilmiştir. Üreme olan plaklardan tanımlama ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları konvansiyonel yöntemler ile Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

Daptomisin ve Linezolid Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Saptanması: Enterokok izolatlarında daptomisin (Sigma Aldrich, ABD) minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin saptanması için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 standartları kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. Daptomisin için son konsantrasyonu 50 μg/ml Ca++ olacak şekilde, katyon ilave edilmiş Mueller-Hinton Broth (MHB) II (BBLTM, Becton Dickinson, ABD) besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan mikroplaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve ertesi gün daptomisin (50 μg/ml Ca^{++}) MİK sonuçları değerlendirilmiştir. Her suş iki kere çalışılmış ve her plakta kontrol suşuna yer verilmiştir. Her sırada üremenin olmadığı ilk kuyucuk MİK değeri olarak saptanmış, sonuçlar European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'de sınır değerler belirtilmediğinden, CLSI 2016'ya göre değerlendirilmiş ve MİK değeri ≤4 μg/ml olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir[19,20].

İzolatların linezolid duyarlılıkları gradiyent test yöntemi (Liofilchem, İtalya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda saptanmıştır. EUCAST standartlarına göre MİK değeri ≤4 μg/ml olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir[20].

Deneylerde kalite kontrol amacıyla *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

BULGULAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan kültürlerinden izole edilen enterokokların 24'ü (%30.4) *E. faecium*, 55'i (%69.6) *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Bütün izolatlar daptomisin ve linezolide karşı duyarlı olarak saptanmıştır[16,17]. *E. faecalis* için daptomisin MİK aralığı 0.006-1 μg/ml, $MİK_{50}$ 0.5 μg/ml ve $MİK_{90}$ 1 μg/ml; linezolid MİK aralığı 0.25-2 μg/ml, $MİK_{50}$ 0.75 μg/ml ve $MİK_{90}$ 1.5 μg/ml olarak saptan-

Tablo 1. Kan kültürlerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatlarında daptomisin ve linezolidin MİK aralıkları, $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri (µg/ml).

		MİK aralığı	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$
Linezolid	*E. faecalis*	0.25-2 µg/ml	0.75µg/ml	1.5 µg/ml
	E. faecium	0.125-2 µg/ml	0.50µg/ml	1 µg/ml
Daptomisin	*E. faecalis*	0.006-1 µg/ml	0.50 µg/ml	1 µg/ml
	E. faecium	0.125-2 µg/ml	0.50 µg/ml	1 µg/ml

mıştır. *E. faecium* için ise daptomisin MİK aralığı 0.125-2 µg/ml, $MİK_{50}$ 0.5 µg/ml ve $MİK_{90}$ 1 µg/ml; linezolid MİK aralığı 0.125-2 µg/ml, $MİK_{50}$ 0.5 µg/ml ve $MİK_{90}$ 1 µg/ml olarak saptanmıştır (Tablo 1).

Enterococcus faecium izolatlarından yalnızca ikisinde vankomisin direnci tespit edilmiştir. Bu izolatların linezolid MİK değerleri 0.5 ve 2 µg/ml daptomisin MİK değeri ise her ikisinde de 1 µg/ml olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Enterokoklar son on yılda sağlık hizmeti ilişkili bakteriyemi, cerrahi alan enfeksiyonları ve üriner sistem enfeksiyonlarından daha sık izole edilmektedir. Yirmiye yakın türü olmasına rağmen, insanlarda en sık izole edilen türler *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur[21].

Daptomisin, Gram-pozitif enfeksiyonların tedavisinde etkinliği kanıtlanmış bir antibiyotiktir. Daptomisin metisiline dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarına ek olarak, enterokok enfeksiyon modellerinde güçlü bakterisidal aktivite gösterdiğinden enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Daptomisin, Gram pozitif patojenlerin tedavisinde vankomisine göre daha az toksik ve daha güvenilir bir antibiyotiktir, çapraz direnç gelişmemesi de çok önemli bir avantajıdır[22].

Çalışmamızda, daptomisine karşı direnç tespit edilmemiş olmakla birlikte, daptomisin MİK değerleri *E. faecalis* için 0.006-1 µg/ml, *E. faecium* için 0.25-2 µg/ml olarak saptanmıştır. Kan kültürlerinden izole edilen 40 *E. faecium* ve 24 *E. faecalis* izolatında daptomisinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada da, bulgularımızla benzer olarak, tüm suşların daptomisine duyarlı olduğu saptanmış ve bu suşların MİK aralığı 0.016-4 µg/ml olarak belirlenmiştir[23].

Daptomisin duyarlılığının çalışmamızdan farklı olarak gradiyent test yöntemi ile çalışıldığı ve VRE'lerde daptomisin duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada, bütün izolatlar daptomisine karşı duyarlı olarak belirlenmiş, $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ sırasıyla 1 ve 2 µg/ml olarak saptanmıştır[23]. Amerika'da 2002-2008 yıllarında yapılan bir çalışmada, izole edilen 4496 *E. faecalis* ($MİK_{90}$=1 µg/m) ve 2875 *E. faecium* ($MİK_{90}$=4 µg/m) izolatından yalnızca birinde daptomisine direnç saptanmıştır[24]. Çalışmamızda, düşük $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerlerinin yalnızca iki izolatın VRE olması ve hastanemizde ampirik tedavide sıklıkla glikopeptidlerin ilk seçenek olarak kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Linezolid de enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla yeğlenen ajanlardan biridir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokokların (n=380) antimikrobiyallere direnç oranlarının araştırıldığı bir çalışmada, en duyarlı ilk üç antimikrobiyal; vankomisin (%99.7), teikoplanin (%99.7) ve linezolid (% 96) olarak belirtilmiştir[2].

Çalışmamızda, linezolid MİK aralığı *E. faecalis* için 0.125-2 µg/ml, *E. faecium* için 0.25-2 µg/ml olarak saptanmıştır ve tüm izolatlar linezolid duyarlı olarak yorumlanmıştır. Kuzey Amerika'da 908 *E. faecium* ve 2369 *E. faecalis*'in dâhil edildiği bir çalışmada, linezolid duyarlılık oranları; vankomisin duyarlı *E. faecium* %95.5, *E. faecalis* %96.5 ve vankomisin dirençli *E. faecium* %97.5,

E. faecalis %95.6 olarak saptanmıştır[26]. Türk Dağı ve ark.'nın[21] 67 *E. faecium* (30'u vankomisine dirençli), 33 *E. faecalis* suşları ile yaptığı çalışmada, linezolid direnç oranı, *E. faecium* suşlarında %2.1, *E. faecalis* suşlarında %2.4 olarak bulunmuştur. Özseven ve ark.'nın[2] yaptığı çalışmada ise, polikliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen enterokokların beşinde (n=114) servislerden gönderilen örneklerden izole edilen enterokokların dokuzunda (n=266) linezolid direnci belirlenmiştir. Aral ve ark.[27] da enterokok izolatlarında linezolid direncini %2 olarak belirtmişlerdir. VRE'lerde linezolid duyarlılığının gradiyent test yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, tüm izolatlar linezolid duyarlı olarak saptanmış ve $MİK_{50}$, $MİK_{90}$ ve MİK aralığı 0.75, 1.5 ve 0.047-2 μg/ml olarak saptanmıştır[24]. Çalışmamızda da, aynı yöntem kullanılarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda, linezolide dirençli izolat saptanmamış olmasına rağmen, linezolide karşı spontan mutasyonlar sonucunda direnç gelişiminin çok düşük düzeylerde gözlendiği, tedavide linezolidin uygun doz yerine suboptimal dozlarda kullanılmasının ise dirençli izolatların ortaya çıkmasına neden olabileceği bildirilmiştir[2].

In vitro olarak daptomisin ve linezolide karşı duyarlılık oranları yüksek olmasına rağmen, yüksek doz daptomisin ile tedavi gören immünsuprese hastalarda daptomisine direnç geliştiren izolatların olduğunu gösteren çalışmalar vardır[28]. Balli ve ark.'nın[29] yaptığı meta analizde ise VRE bakteriyemisinde linezolid tedavisinin daptomisine göre daha etkili olduğu ve mortalite oranlarının daha düşük olduğu belirtilmesine karşın, linezolidin kısmen hematolojik yan etkilerinin olması uzun süreli kullanımını kısıtlamaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda daptomisin ve linezolide dirençli suş saptanmamasına rağmen, bu iki antimikrobiyal ajanın MİK değerlerinin izlenerek, MİK değerlerindeki değişimlerin yakından takip edilmesi, antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre, gerekli olduğunda uygun endikasyonlarda, yeterli doz ve sürelerde kullanılmasının önemine dikkat çekmek istenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Güçkan R, Elmas A, Tilgel S, Yüksel G.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Int J Basic Clin Med* 2013; 1:74-7.
2. **Özseven AG, Sesli Çetin E, Cicioğlu Arıdoğan B, Çiftçi E, Özseven L.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2011; 25:256-62.
3. **Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda W, Koneman EW, Schreckenberger P, Woods GL (eds).** The gram-positive cocci: Part II: Streptococci, Enterococci, and the "*Streptococcus*-like" bacteria. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2017:739-816.
4. **Goh HMS, Yong MHA, Chong KKL, Kline KA.** Model systems for the study of *Enterococcal* colonization and infection. *Virulence* 2017; (baskıda) https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1279766
5. **Collin BA, Leather HL, Wingard JR, Ramphal R.** Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin Infect Dis* 2001; 33:947-53. https://doi.org/10.1086/322604
6. **Moise PA, North D, Steenbergen JN, Sakoulas G.** Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:617-24. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70200-2
7. **King A, Phillips I.** The in vitro activity of daptomycin against 514 Gram-positive aerobic clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:219-23. https://doi.org/10.1093/jac/48.2.219
8. **Hayden MK, Rezai K, Hayes RA, Lolans K, Quinn JP, Weinstein RA.** Development of daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5285-7. https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5285-5287.2005
9. **Rybak MJ, Hershberger E, Moldovan T, Grucz RG.** In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin- intermediate and -resistant strains. A*ntimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1062-6. https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.1062-1066.2000
10. **Tabak F.** 2010'da daptomisin. *ANKEM Derg* 2010; 24(Ek 2):E110-3.
11. **Aktaş D, Derbentli Ş.** Daptomisinin VRE ve MRSA suşlarına in vitro etkinliği. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:123-8.
12. **Stevens DL, Wallace RJ, Hamilton SM, Bryant AE.** Successful treatment of staphylococcal toxic shock syndrome with linezolid: a case report and in vitro evaluation of the production of toxic shock syndrome toxin type 1 in the presence of antibiotics. *Clin Infect*

Dis 2006; 42:729-30.
https://doi.org/10.1086/500265

13. **Wilcox MH.** Efficacy of linezolid versus comparator therapies in gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(Suppl 2):Sii27-35.
https://doi.org/10.1093/jac/dkg251
14. **Fraser A, Paul M, Almanasreh N, et al.** Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay. *Am J Med* 2006; 119:970-6.
https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.034
15. **Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al.** Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34:1589-96.
https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9
16. **Choo EJ, Chambers HF.** Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Chemother* 2016; 48:267-73.
https://doi.org/10.3947/ic.2016.48.4.267
17. **Arias CA, Murray BE.** Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6:637-55.
https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.637
18. **Green SL, Maddox JC, Huttenbach ED.** Linezolid and reversible myelosupression. *JAMA* 2001; 285:1291.
https://doi.org/10.1001/jama.285.10.1291
19. **CLSI.** Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S26. Clinical Laboratory Standards Institute, 2016.
20. The European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2016. http:/www.eucast.org
21. **Türk Dağı H, Arslan U, Uğur AR, Alp F, Fındık D, Tuncer İ.** Kan kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarının daptomisine duyarlılığı. *ANKEM Derg* 2012; 26:111-5.
22. **Cantón R, Ruiz-Garbajosa P, Chaves RL, Johnson AP.** A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1126-36.
https://doi.org/10.1093/jac/dkq087
23. **Hancı H, Uyanık MH, Gültekin E, Erdil Z, Coşkun MV, Uslu H.** Daptomisinin kan kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarına in-vitro etkinliği. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2014; 44:91-7.
24. **Parlak M, Binici İ, Çıkman A, Karahocagil MK, Bayram Y, Berktaş M.** Vankomisine dirençli enterokoklarda linezolid, tigesiklin ve daptomisin duyarlılığının E-Test yöntemiyle araştırılması. *Dicle Tıp Derg* 2014; 41:534-7.
https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2014.03.0469
25. **Sader HS, Jones RN.** Evaluation of daptomycin activity tested against 35,058 bacterial strains from hospitalized patients: summary of a 7 year surveillance program for North America (2002–2008). Abstracts of the Forty-seventh Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; Philadelphia, PA. Arlington, VA, USA: Infectious Diseases Society of America; 2009;P199.
26. **Ballow CH, Jones RN, Biedenbach DJ; North American ZAPS Research Group.** A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43:75-83.
https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00334-0
27. **Aral M, Paköz NİE, Aral İ, Doğan S.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68:85-92.
28. **Matono T, Hayakawa K, Hirai R, et al.** Emergence of a daptomycin-non-susceptible *Enterococcus faecium* strain that encodes mutations in DNA repair genes after high-dose daptomycin therapy. *BMC Res Notes* 2016; 9:197.
https://doi.org/10.1186/s13104-016-2003-9
29. **Balli EP, Venetis CA, Miyakis S.** Systematic review and meta-analysis of linezolid versus daptomycin for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:734-9.
https://doi.org/10.1128/AAC.01289-13

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):131-137, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.131

Araştırma

Menenjit Etkenlerinin Real-time PCR Yöntemiyle Araştırılması

Oya AKKAYA*, Hülya İren GÜVENÇ, Asuman GÜZELANT*, Meral KAYA*, Şerife YÜKSEKKAYA*, Ayşegül OPUŞ*, Muhammet Güzel KURTOĞLU*, Habibe ÖVET***

**Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Konya Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya*

***Batman Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Batman*

ÖZ

Amaç: *Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları, hızlı ilerleyerek ölüme veya ciddi kalıcı sekellere yol açabilmesi nedeniyle, hızlı tanı gerektiren hastalıkların başında gelir. Bu çalışmanın amacı, retrospektif olarak multiplex real-time PCR yöntemiyle BOS örneklerinden saptanan viral ve bakteriyel etkenlerin, yaşa ve mevsimlere göre dağılımını göstermektir.*

Gereç ve Yöntem: *Bu çalışmaya hastanemiz moleküler ünitesine menenjit kuşkusuyla gönderilen 200 hastanın BOS örneği dâhil edildi. Viral etkenlerden adenovirus (AdV), sitomegalovirus (CMV), enterovirus(EV), Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex virus 1 ve 2 (HSV), insan herpesvirus 6 ve 7, insan parechovirus, parvovirus B19, varisella-zoster virus (VZV), bakteriyel etkenlerden de Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis ve Streptococcus pneumoniae pozitifliği multiplex real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırıldı.*

Bulgular: *Çalışmaya alınan 200 hasta örneğinin 50'sinde (%25) bakteriyel veya viral bir etken tespit edildi. Pozitif örneklerde enterovirus %6,5'lik oranla ilk sırada yer alırken, adenovirus ve HSV-1 %5 ile ikinci sırada, S. pneumoniae ise %3,5 ile üçüncü sırada yer aldı. Pozitiflik oranının en yüksek olduğu yaş aralığı 0-5 yaş idi. Dokuz hastada bakteri pozitif bulundu. İki örnekte iki virus koenfeksiyonu görüldü.*

Sonuç: *Menenjitlerde mortalite ve morbiditeyi azaltmak için erken tanı ve tedavi çok önemlidir. PCR gibi moleküler yöntemlerle etkenlerin erken saptanması olası olmaktadır. Multiplex PCR testleri kolay ve hızlı testlerdir ve çalışma sayısının artmasıyla epidemiyolojik verilerin daha da zenginleşeceği görüşüne varılmıştır.*

Anahtar kelimeler: *Beyin omurilik sıvısı, polimeraz zincir reaksiyon, santral sinir sistemi enfeksiyonları*

ABSTRACT

Investigation of the Causative Agents of Meningitis By Real-Time PCR Method

Objective: *Central nervous system (CNS) infections require rapid diagnosis because of their rapid progression to death or severe permanent sequelae. The aim of this study is to demonstrate retrospectively, the distribution of viral and bacterial agents detected by multiplex real-time PCR method in CSF samples in terms of patients' age and season of the infection.*

Material and Methods: *CSF samples of 200 patients which were sent to the molecular microbiology unit of our hospital with suspect meningitis were investigated in this study. Specimens were tested using multiplex real-time PCR assay for adenovirus (AdV), cytomegalovirus (CMV), enteroviruses (EV), Epstein- Barr virus (EBV), herpes simplex virus 1 and 2 (HSV), human herpes virus 6 and 7, human parechovirus, parvovirus B19, varicella-zoster virus (VZV) and among the bacterial pathogens Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis and Streptococcus pneumoniae.*

Results: *A bacterial or a viral agent was detected in 50 (25%) of the 200 samples analyzed in the study. Among positive samples most frequently (6.5%) enterovirus was detected, followed by adenovirus and HSV-1 (5%), and S. pneumoniae (3.5%). The highest rate of positivity was detected within age bracket of 0-5 years. Bacterial positivity was detected in 9 patients. The two viral coinfections were seen in 2 (1%) patients.*

Conclusion: *Early diagnosis and treatment of meningitis are very important to reduce mortality and morbidity. Early detection of the responsible agents may be possible with molecular methods, such as PCR. Multiplex PCR method is an easy and rapid test and it is considered that as the relevant studies increase in number, it will enrich the epidemiologically valuable data.*

Keywords: *Cerebrospinal fluid, polymerase chain reaction, central nervous system infections*

Alındığı tarih: 08.02.2017
Kabul tarihi: 21.04.2017
Yazışma adresi: Oya Akkaya, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Konya Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya
e-posta: oyaakkaya12@gmail.com

GİRİŞ

Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları; menenjit, ensefalit, ensefalomiyelit, beyin apsesi, subdural ampiyem, epidural apse, intrakraniyal flebit gibi değişik klinik tablolarla seyredebilir. Beyin omurilik sıvısının inflamasyonu olarak tanımlanan menenjit, antimikrobiyal tedavi yöntemlerinde elde edilen gelişmeye rağmen, ciddi mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Klinik tablonun hızlı ilerlemesi, ölüme veya ciddi kalıcı sekellere yol açabilmesi nedeniyle, hızlı tanı gerektiren hastalıkların başında gelir. Enfeksiyonlar akut veya kronik seyirli olabilir. Akut pürülan menenjitler genellikle bakteriyel, akut aseptik menenjitler ise genellikle viral etkenlidir. Menenjitlerin etiyolojik dağılımı, yaş, coğrafi farklılıklar, mevsim ve sosyoekonomik koşullara bağlı olarak önemli değişiklikler göstermektedir. Akut bakteriyel menenjit olgularının %80-85 kadarından *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* ve *Haemophilus influenzae* sorumlu olmasına karşın, belli yaşlarda ve bazı durumlarda etkenlerin görülme sıklığı değişebilir[1,2]. Etiyolojinin belirlendiği aseptik menenjit olgularının ise %80-95'inden polio dışı enterovirusların sorumlu olduğu bildirilmiştir[3].

Viral menenjit tablosu, beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda Gram boyama ve kültür teknikleri ile etken saptanamayan, BOS'ta protein artışı ve hücre artışının (genellikle lenfosit) olduğu tablodur[4,5]. Virüslerin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması çok geç olur. Hastanın klinik tablosu ilerledikten sonra, retrospektif olarak tanı konmuş olur[6]. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile aseptik menenjit etkenlerini belirlemedeki başarı günümüzde %50-70'lere ulaşmıştır. Bu başarıda özellikle nükleik asit saptama testlerinin kullanımı rol oynamıştır[7].

Birçok virus benzer klinik tablolar oluşturabildiği için, eşzamanlı birden fazla etkeni belirleyebilecek PCR yöntemleri tanımlanmıştır. Viral etkenlerin hızlı, duyarlı ve özgül olarak tanınması, gereksiz antibiyotik veya antiviral kullanımını, invaziv ve pahalı ek testlerin yapılmasını önleyerek ve hastanede kalış süresini azaltarak da kazanımlar sağlamakta; epidemiyolojik bilgiler toplanabilmekte, koruyucu ve tedavi edici çalışmalar yapılabilmektedir[8].

Viral ve bakteriyel menenjitte klinik seyir başlangıçta aynıdır ama prognozu ve tedavisi farklıdır. Bu nedenle etiyolojinin bakteriyel mi yoksa viral mi olduğunu ayırmak acil olarak yapılması gereken bir durumdur[9]. Viral menenjitlerin en sık nedeni enteroviruslardır. Enteroviruslar dünya genelinde yaz ve sonbaharda yaygın olarak görülürler, çocuklarda daha sık etkendirler. Enterovirusların oluşturduğu SSS enfeksiyonlarının, yetişkin şizofrenisi ve diğer psikozlarla ilişkili olabileceğini gösteren yayınlar vardır[10,11]. Ayrıca kardiyomiyopatilere ve diğer başka organ bozukluklarına neden olabilir. Virusun virulansı serotipe göre değişir, bu nedenle virusun adı ve serotipi bilinirse ona göre antiviral geliştirmek ve fekal oral bulaşan enterovirusa yönelik korunma sağlanması olası olabilir[12].

Bakteride ise yaş, coğrafi farklılıklar, mevsim, toplumun belirli etkenlere karşı aşılı olup olmaması, genetik yapı, sosyoekonomik koşullar gibi risk faktörlerine bağlı olarak değişmekle birlikte, dünyada ve ülkemizde en sık tespit edilen etkenler, *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* tip b ve *Haemophilus influenzae*'dır. Erken tanı ve tedavinin son derece önemli olduğu bu hastalıkta menenjit bulguları ile gelen olgular hızla değerlendirilmeli ve hemen uygun antimikrobiyal tedavi başlanmalıdır. Bu sayede ölüm oranını azaltmak ve komplikasyonsuz iyileşmeyi artırmak olası olmaktadır[13,14]. Bakteriyel menenjit şüphesi olan hastada rutin tanı koyma yöntemi, BOS Gram boyama ve BOS kültürüdür. Ama kültürün en az 2 günde sonuçlanması

bir dezavantajdır. PCR'ın, bakteri kültürüne karşı en büyük avantajı ise hızlı sonuçlanması, canlı bakteri gerektirmemesi ve yüksek duyarlılığa sahip olmasıdır[15]. Menenjit şüpheli hastaya, yatıştan ve BOS örneği alınmadan önce genellikle antibiyotik verildiği için, bakteriyel etkenin kültürde üretilmesi zorlaşmaktadır. Bu nedenle nükleik asit temelli testler bakteriyi belirlemede de önemlidir[16]. Bu çalışmada, hastanemiz Moleküler ünitesine, SSS enfeksiyonu ön tanısı düşünülerek gönderilen BOS örneklerinden "Multiplex real-time PCR" yöntemiyle, viral ve bakteriyel etkenlerin belirlenmesi, bu etkenlerin yaşa ve mevsimlere göre değerlendirilmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastanemiz Moleküler Ünitesi'ne, Ocak 2014-Aralık 2014 tarihleri arasında menenjit ön tanısı düşünülerek gönderilen toplam 200 BOS örneğinde, PCR yöntemiyle bulunan sonuçlar retrospektif olarak değerlendirildi. İki yüz örneğin, 160'ı 15 yaşın altında ve 40'ı 15 yaşın üzerindeydi.

BOS örnekleri için, "multiplex real-time PCR" yöntemi (FTD NEURO9 ve FTD Bacterial Meningitis, Fast-Track Diagnostics, Lüksemburg) kullanıldı. "FTD NEURO9" ve "FTD Bacterial meningitis mPCR" sisteminin çalışma panelinde adenovirus (AdV), cytomegalovirus (CMV), enterovirus (EV)'lar (poliovirus, coxackievirus, echovirus ve diğer enteroviruslar), Epstein Barr virus (EBV), herpes simplex virus 1 ve 2, insan herpesvirus 6 ve 7, insan parechovirus ve parvovirus B19, varicella-zoster virus (VZV), *H. influenzae, N. meningitidis* ve *S. pneumoniae* olmak üzere 14 virus ve 3 bakteri vardır.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 200 BOS örneğinin 50'sinde (%25) etken belirlendi. Pozitif örneklerde enterovirus %6.5'lik oranla ilk sırada yer alırken, adenovirus ve HSV-1 %5 ile ikinci sırada, *S. pneumoniae* ise %3.5 ile üçüncü sırada yer aldı (Tablo 1). 27 (%13.5) pozitif hasta 0-5 yaş aralığında, 10 (%5) pozitif hasta 5-10 yaş aralığında, yedi (%3.5) pozitif hasta 10-15 yaş aralığında ve altı (%3) pozitif hasta 15 yaş üzeridir (Tablo 2). En sık menenjit etkeni olarak 13 hastada pozitif bulunan enterovirusun yalnızca biri 15 yaş üzerindeydi. Pozitiflik oranının en yüksek olduğu yaş aralığı 0-5 yaş oldu. Dokuz hastada bakteri pozitif bulundu. Bunların kültürlerine bakılınca yalnızca yedisinde *S. pneumoniae*'nın ve birinde de *N. meningitidis*'in ürediği görülmüştür. EV ve ADV'ye en sık yaz aylarında rastlandı. İki örnekte EV ve AdV birlikteliğiyle ortaya çıkan iki virus koenfeksiyonu görüldü.

Tablo 1. Menenjit etkenlerinin oranları.

Saptanan etken	Sayı (%)
Enterovirüs	13 (%6.5)
Adenovirüs	10 (%5)
HSV-1	10 (%5)
HHV-6	5 (%2.5)
HSV-2	1 (%0.5)
Streptococcus pneumoniae	7 (%3.5)
Neisseria meningitidis	2 (%1)
İki virus koenfeksiyonu	2 (%1)
TOPLAM	50 (%25)

HSV: herpes simpleks virüs; HHV: insan herpesvirus

Tablo 2. Pozitiflik saptanan etkenlerin yaş gruplarına göre dağılımı.

Saptanan etken	0-5 yaş	5-10 yaş	10-15 yaş	15 yaş üstü	Toplam
EV	7	3	**2**	1	13
AdV	5	2	**2**	1	10
HSV-1	6	4	**-**	-	10
HSV-2	1	-	**-**	-	1
HHV-6	4	1	**-**	-	5
Streptococcus pneumoniae	2	-	**3**	2	7
Neisseria meningitidis	-	-	**-**	2	2
İki virüs koenfeksiyonu	2	-	**-**	-	2
Toplam	27	10	**7**	6	50

EV: enterovirüs, AdV: adenovirüs, HSV: herpes simpleks virüs; HHV: insan herpesvirüs

Çalışmamızda en sık pozitiflik Tablo 3'te görüldüğü gibi Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül gibi yaz aylarında oldu. Bizde en sık etken olan EV ve AdV yaz aylarında görülürken, *S. pneumoniae*'a ise tüm aylarda rastlandı.

Tablo 3. En sık saptanan etkenlerin aylara göre dağılımı.

AYLAR	EV	AdV	HSV-1	HSV-2	HHV-6	Ko-enfeksiyon	*Streptococcus pneumoniae*	*Neisseria meningitidis*
Ocak	1	-	1	-	2	2	1	-
Şubat	1	-	-	-	-	-	1	2
Mart	-	-	-	-	1	-	1	-
Nisan	-	-	-	-	1	-	-	-
Mayıs	-	-	2	-	-	-	-	-
Haziran	4	3	-	-	1	-	1	-
Temmuz	3	3	3	-	-	-	-	-
Ağustos	3	3	2	-	-	-	-	-
Eylül	1	-	1	-	-	-	1	-
Ekim	-	-	-	1	-	-	-	-
Kasım	-	1	1	-	-	-	2	-
Aralık	-		-	-	-	-	-	-
Toplam	13	10	10	1	5	2	7	2

EV: enterovirüs, AdV: adenovirüs, HSV: herpes simpleks virüs; HHV: insan herpesvirüs

TARTIŞMA

Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları, son yıllarda geliştirilen aşılar ve antimikrobiyal tedavi protokollerine rağmen, yüksek morbidite ve mortalitesi ile bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir[1]. SSS enfeksiyonlarının %30'u viral ve bakteriyel menenjitlerdir[17]. Menenjit etkenleri ise yaşa, mevsime, bulunulan coğrafi bölgeye, ülkelerin gelişmişlik düzeylerine ve kullanılan aşılara göre farklılıklar göstermektedir[18]. PCR gibi amplifikasyon temelli yöntemlerle, viral nükleik asidin BOS'da saptanması, SSS enfeksiyonlarının tanısında önemli bir dönüm noktası olmuş ve böylece viral etkenleri belirlemedeki başarı %20-30'lardan, günümüzde %50-70'lere ulaşmıştır[8]. BOS'da PCR yöntemiyle etken arama, HSV, CMV ve enteroviral menenjit tanısı için önerilen tanı yöntemidir[8-19]. HSV menenjitleri, viral menenjitlerin %1-3'ünü oluşturur. Bu çalışmada, HSV oranı %5 bulundu. HSV enfeksiyonunda erken tanı sayesinde başlanacak antiviral tedavi, prognozu önemli ölçüde etkilemektedir. Özellikle bağışık sistemi baskılanmış bireylerde, PCR ile erken tanı konup, antiviral tedaviye başlanabilmekte ve böylece nörolojik komplikasyonlar azaltılabilmektedir. Etkenin HSV olduğundan şüphelenilen menenjitlerde, BOS'ta PCR ile HSV-DNA saptanması değerlidir, sensitivite ve spesifitesi yüksektir[20].

Bu çalışmada kullanılan yöntem kalitatif bir yöntemdir. Ama döngü sayısını gösteren Ct (Cycle Thresold) değerinin düşük olması, HSV-DNA kopya sayısının yüksek olduğunu yani virusun miktarının fazla olduğunu gösterir. Çalışmada HSV-DNA saptanan hastalarda Ct değeri 25-30 arasındayken özellikle 2 hastada Ct değeri 25.6 gibi çok düşük bulundu. Bu hastalar, HSV menenjiti şüphesiyle yatan, 0-5 yaş aralığında 2 hastaydı. Bu hastalarda saptanan Ct değerleri ve anlamı hakkında klinisyene bilgi verildi. Hastalardan birinin beyin manyetik rezonans görüntülemesinde (MRG), iki taraflı temporal lop tutulumu olması HSV enfeksiyonunu doğruladı.

Geleneksel yöntemler olarak bilinen hücre kültürü yönteminin çok uzun sürmesi, BOS'ta viral antikor arama yönteminde de antikorların iyileşme döneminde pozitifleşmesi gibi nedenlerle bu yöntemlerin kullanılabilirliği azalmıştır. Viral nükleik asitlerin BOS ta saptanmasıyla, menenjitlerin tanısında çok önemli bir yol alınmıştır. Bu testlerinin kullanımı ile virusların oluşturdukları değişik klinik tabloların fark edilmesi de sağlanmıştır[8].

Çalışmamızda, 200 BOS örneğinin 50 (%25)'sinde

bakteriyel veya viral bir etken bulundu. Ülkemizde konu ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda, çocukluk yaş grubunda viral etkenlerin araştırıldığı kapsamlı çalışmalara çok az rastlanılmaktadır. Çalışmamız ise hem erişkin hem de çocuk hastaları kapsayıp, menenjitte en sık görülen viral ve bakteriyel etkenleri de aynı anda saptadı. Bu nedenle bizden sonraki çalışmalara katkı sağlayacağı düşüncesine varıldı.

EV, aseptik menenjitin ilk sıradaki nedenidir ve viral menenjitin genel klinik özelliklerini büyük ölçüde yansıtır[21]. Etiyolojinin belirlendiği aseptik menenjit olgularının % 85-95'inden poliodışı enteroviruslar sorumludur. Sağlıklı insanlarda farklı EV serotipleriyle birkaç kez aseptik menenjit oluşabilir. EV salgınlar yapabilir ve ılıman iklim kuşağında yaz ve sonbahar döneminde görülür. Özellikle sıcak hava ve iklim koşullarında EV fekal-oral yayılımı artar. EV menenjiti açısından en duyarlı grup sütçocukları ve küçük çocuklardır[8,22]. Çalışmamızda da, EV %25 ile en sık etken olarak yer aldı. Tüm EV lerin yarısı 0-5 yaş aralığında ve yaz aylarında saptandı. Ülkemizden bildirilen diğer çalışmalarda BOS örneklerinde EV pozitiflik oranı değişmektedir. Kılıç ve ark.'nın[3] RT-PCR yöntemiyle SSS enfeksiyonu etkenlerini aradığı çalışmada %8 oranında EV pozitifliği bulunmuştur. 2013'te Kore'de Dahee Jin ve ark.[23] tarafından menenjitli hastalar üzerinde yapılan 3 yıllık bir çalışmada, EV %33 oranında yine en sık rastlanan ajan bulunmuştur[23].

Hücre kültürü ile PCR'nin karşılaştırıldığı çalışmalarda, BOS'dan yapılan hücre kültürünün duyarlılık ve özgüllüğü %50-70 iken, RT-PCR testinin duyarlılık ve özgüllüğünün ise %90'ın üzerinde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca BOS'taki EV miktarı çok düşük olunca hücre kültüründe üreme günler sürebilirken, PCR ile aynı gün sonuç verilebilmesi bir avantaj olarak değerlendirilmiştir[8].

2007-2012 yılları arasında Xie ve ark.'nın[24] Çin'de yaptığı bir çalışmaya, akut menenjit ve ensefalit öntanılı yaklaşık 2000 hasta dahil edilmiş ve 137 EV ve 123 Japon ensefaliti virüsü pozitif bulunmuştur. Akut menenjitlerde en sık etkenin viruslar olduğu ve en sık rastlanan virusun da EV olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada, ayrıca 103 örnekte bakteri pozitifliği bulunmuştur.

Othman'ın[12] 2011-2013 yılları arasında, menenjit öntanılı 215 hastada Tunus'ta yaptığı bir çalışmada, EV'nin değişik antijenik tiplerinin değişik klinik tablolara neden olduğu ve her farklı antijenik tipin farklı viral yüklere neden olduğu gösterilmiştir.

Cabrerizo ve ark.'nın[25] 84 menenjit öntanılı yenidoğanda yaptığı bir çalışmada EV %38 oranında pozitif bulunmuştur ve çalışmamızdaki gibi ilkbahar ve yaz aylarında görülme sıklığı artmıştır. EV oranının bu kadar yüksek olmasının bir nedeni, virüsün yaz aylarında artması, bir diğer nedeni de bize göre kullanılan testin duyarlılığının yüksek olmasıdır. El Hiar ve ark.'nın[26], SSS enfeksiyonu öntanılı 60 hastadan yaptığı çalışmanın 20'sinde EV pozitifliği görülmüş, bunun da %45'i 0-2 yaş aralığında ve %35'i 2-5 yaş aralığında bulunmuştur. EV yine ilkbahar ve yaz aylarında en sık görülmüştür.

Çalışmamızda viruslarda en sık etken enterovirus iken bakterilerde ise *S. pneumoniae* bulunmuştur. *S. pneumoniae*, toplum kaynaklı bakteriyel menenjitlerin en sık ve en sekelli etiyolojik ajanıdır[18]. Duman ve ark.'nın[13] yaptığı 3 yıllık bir retrospektif çalışmada, *S. pneumoniae* %15 oranıyla koagülaz negatif stafilokoklardan sonra ikinci sırada yer almıştır. Abuhandan ve ark.'nın[27], menenjit öntanılı 92 olguluk çalışmada üreyen 14 BOS'un 6'sında etken *S. pneumoniae* olmuştur. Çalışmamızda ise 7 (%3.5) hastada *S. pneumoniae* etken olarak bulundu. Ramautar ve ark.'nın[28], menenjit öntanılı hastalardan yap-

tığı çalışmada ise, kültür sonucunun en az 48 saatte çıkması ve eğer hastaya antibiyotik verilmişse hastada üremenin olmaması gibi nedenlerden dolayı PCR yönteminin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Hatta, eğer hasta antibiyotik kullanmışsa, PCR ve Gram boyamanın birlikte yapılmasının çok etkili bir tanı yöntemi olabileceği üzerinde durulmuştur[28]. PCR çalışması ile 4 saatten daha kısa bir sürede hastalara sonuç verilir. Bu da klinisyenin daha erken tedaviye başlaması, hastanın erken iyileşmesi ve dolayısıyla yatış maliyetinin düşmesiyle sonuçlanır[29,30].

H. influenzae'nın izole edilememesi, *Haemophilus* cinsi bakterilerin hassas ve zor üreyen bakteriler olmasıyla ve örneklerin hem alımında hem de laboratuvara ulaştırılmasında oluşan gecikmelerle ilgili olabilir. Çalışmamızda, hiç *H.influenzae* izole edilemedi. Gültepe ve ark.'nın[1] 2015'te yaptığı 100 hastalık PCR çalışmasında, 1 tane *H. influenzae*'ya rastlanmıştır. Teleb ve ark.'nın[31], Doğu Akdeniz ülkelerinde menenjit öntanılı hastalardan yaptığı bir sürveyans çalışmasında da, 2008'de populasyona *H. influenzae* aşısının uygulandığı ve aşıdan sonra *H. influenzae* menenjit olgu sayısının sıfıra indiği vurgulanmıştır. Kültür ve PCR'nin karşılaştırmalı çalışmaları sonucunda PCR'ın hızlı ve güvenilir bir test olduğu ve bu nedenle bakteriyel menenjit tanısı için de kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Çalışmamızda, 2 örnekte EV - AdV birlikteliği tespit edildi. Koenfeksiyona 0-5 yaş aralığında ve ocak ayında rastlandı.

Sonuç olarak, menenjitler yaşamı tehdit eden enfeksiyonlardır ve antibiyotik ve antiviral ilaçlarla tedavi edilebilirler. Bu nedenle etkenin hızlı bir şekilde tespit edilebilmesi çok önemlidir. Menenjit şüpheli hastalarda, PCR gibi moleküler yöntemlerle, viral veya bakteriyel etkenlerin erken saptanması olası olmaktadır. Etkenin erken saptanmasıyla hem epidemiyolojik tedbirler alınmakta hem de hastaneye gereksiz yatışlar azaltılabilmekte, bilgisayarlı tomografi (BT) ve magnetik rezonans (MR) gibi tetkikler daha az kullanılabilmekte ve gereksiz antibiyotik kullanımı önlenerek ciddi ekonomik kazançlar sağlanabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Gültepe B, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Berktaş M.** Bir üniversite hastanesinde bakteriyel ve viral menenjit etkenlerinin farklı PCR yöntemleri ile araştırılması. *Abant Med J* 2015; 4:125-9. https://doi.org/10.5505/abantmedj.2015.64325
2. **Soylar M, Altuğlu İ, Sertöz R, Aydın D, Akkoyun F, Zeytinoğlu A.** Ege Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran santral sinir sistemi enfeksiyonu olgularında saptanan viral etkenler. *Ege Tıp Dergisi* 2014; 53:65-70.
3. **Kılıç I, Altuğlu I, Çiçek C, Pullukçu H, Bayram N, Sirin H, Erensoy S.** Santral sinir sistemi enfeksiyonu etkeni enterovirusların RT-PCR ve hücre kültür yöntemleri ile saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:468-77.
4. **Wang YJ, Chiua NC, Ho CS, Chia H.** Comparison of childhood aseptic meningitis with bacterial meningitis in a tertiary children's hospital of Taiwan. *J Meningitis* 2016, 1:103.
5. **Demiroğlu YZ, Turunç T, Alışkan H, Çolakoğlu Ş, Erdoğan AF, Arslan H.** Toplum kökenli menenjit/meningoensefalitler: Beş yılın retrospektif değerlendirilmesi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30:218-26. https://doi.org/10.5336/medsci.2008-8623
6. **Davies N, Brown LJ, Gonde J, et al.** Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:82-7. https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.045336
7. **Jarrin I, Sellier P, Lopes A, et al.** Etiologies and management of aseptic meningitis in patients admitted to an internal medicine department. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95:e2372 https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002372
8. **SayınerAA.** Viral merkezi sinir sistemi infeksiyonlarında tanı. *ANKEM Derg* 2005; 19(Ek 2):E130-6.
9. **Kelly C, Sohal A, Michael BD, et al.** Suboptimal management of central nervous system infections in children: a multi-centre retrospective study. *BMC Pediatrics* 2012; 12:145. https://doi.org/10.1186/1471-2431-12-145
10. **Rahimi P, Roohandeh A, Sohrabi A, Mostafavi E, Bahram Ali GB.** Impact of human enterovirus 71 genotypes in meningoencephalitis in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8:e27113. https://doi.org/10.5812/jjm.27113
11. **Krasota A, Loginovskih N, Ivanova O, Lipskaya G.** Direct identification of enteroviruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected meningitis by nested

PCR amplification. *Viruses* 2016; 8:E10. https://doi.org/10.3390/v8010010

12. **Othman I, Romain Volle R, Elargoubi A, Guediche M, Chakroun M, Sfar M.** Enterovirus meningitis in Tunisia (Monastir, Mahdia, 2011-2013): identification of virus variants cocirculating in France. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84:116-22. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.019
13. **Duman Y, Yakupoğulları Y, Tekerekoğlu MS, Güçlüer N, Otlu B.** Bir üniversite hastanesi laboratuvarında beyin omurilik sıvısında izole edilen mikroorganizmaların üç yıllık geriye dönük analizi. *Dicle Tıp Derg* 2012; 39:70-4. https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2012.01.0097
14. **Akhvlediani T, Bautista CT, Shakarishvili R, et al.** Etiologic agents of central nervous system infections among febrile hospitalized patients in the country of Georgia. *PLoS One* 2014; 9:e111393. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111393
15. **Amin M, Ghaderpanah M, Tahereh Navidifar T.** Detection of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in CSF specimens of children suspicious of meningitis in Ahvaz, Iran. *Kaohsiung J Med Sci* 2016; 32:501-6. https://doi.org/10.1016/j.kjms.2016.08.009
16. **Shin SY, Kwon KC, Park JW, Ji JM, Koo SH.** Evaluation of the Seeplex® Meningitis ACE Detection Kit for the detection of 12 common bacterial and viral pathogens of acute meningitis. *Ann Lab Med* 2012; 32:44-9. https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.1.44
17. **Khatib U, van de Beek D, Lees JA, Brouwer MC.** Adults with suspected central nervous system infection: A prospective study of diagnostic accuracy. *J Infect* 2017; 74:1-9. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.09.007
18. **Pehlivanoğlu F, Yaşar KK, Şengöz G.** Beyin omurilik sıvısından izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2011; 25:1-5.
19. **Kaewpoowat Q, Salaza L, Aguilera E, Wootton SH, Hasbun R.** Herpes simplex and varicella zoster CNS infections: clinical presentations, treatments and outcomes. *Infection* 2016; 44:337-45. https://doi.org/10.1007/s15010-015-0867-6
20. **Momméja-Marin H, Lafaurie M, Scieux C, Galicier L, Oksenhendler E, Molina JM.** Herpes simplex virus type 2 as a cause of severe meningitis in immunocompromised adults. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1527-33. https://doi.org/10.1086/379520
21. **Arısoy ES.** Viral menenjit. Turkiye Klinikleri. *J Pediatr-Special Topics* 2004; 2:237-43.
22. **Ozkaya E, Hizel K, Uysal G, Akman S, Terzioglu S, Kuyucu N.** An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type 30 in two cities of Turkey. *Eur J Epidemiol* 2003; 18:823-6. https://doi.org/10.1023/A:1025334116364
23. **Jin D, Heo TH, Byeon JH, et al.** Analysis of clinical information and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for early diagnosis of enteroviral meningitis. *Korean J Pediatr* 2015; 58:446-50. https://doi.org/10.3345/kjp.2015.58.11.446
24. **Xie Y, Tan Y, Chongsuvivatwong V, et al.** A population-based acute meningitis and encephalitis syndromes surveillance in Guangxi, China, May 2007-June 2012. *PloS One* 2015;10:e0144366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144366
25. **Cabrerizo M,Trallero G, Pena MJ, et al.** Comparison of epidemiology and clinical characteristics of infections by human parechovirus vs. those by enterovirus during the first month of life. *Eur J Pediatr* 2015; 174:1511-6. https://doi.org/10.1007/s00431-015-2566-9
26. **El Hiar R, Haddad S, Jaidane H, et al.** Enteroviral central nervous system infections in children of the region of Monastir, Tunisia: Diagnosis, laboratory findings of cerebrospinal fluid and clinical manifestations. *Indian J Virol* 2012; 23:294-302. https://doi.org/10.1007/s13337-012-0104-1
27. **Abuhandan M, Çalık M, Oymak Y, ve ark.** Çocuklarda menenjit: 92 olgunun değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Derg* 2013; 40:15-20. https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2013.01.0217
28. **Ramautar A, Halse T, Arakaki L, et al.** Direct molecular testing to assess the incidence of meningococcal and other bacterial causes of meningitis among persons reported with unspecified bacterial meningitis. *Diagn Microb Infect Dis* 2015; 83:305-11. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.005
29. **Moayedi AR, Nejatizadeh A, Mohammadian M, Rahmati MB, Namardizadeh V.** Accuracy of universal polymerase chain reaction (PCR) for detection of bacterial meningitis among suspected patients. *Electron Physician* 2015; 8:1609-12. https://doi.org/10.19082/1609
30. **Ninove L, Nougairede A, Gazin C, et al.** Comparative detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid: GeneXpert system vs. real-time RT-PCR assay. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1890-4. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03487.x
31. **Teleb N, Pilishvili T, van Beneden C, et al.** Bacterial meningitis surveillance in the Eastern Mediterranean region, 2005-2010: successes and challenges of a regional network. *J Pediatr* 2013; 163(Suppl 1):S25-31. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.03.027

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):138-145, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.138

Araştırma

Boğaz Sürüntü Örneklerinde A Grubu Beta-Hemolitik Streptokokların Belirlenmesinde Bionexia Strep A Plus Hızlı Antijen Testinin Kullanımı

Nurcan SAYĞILI, Emin BULUT, Rıdvan DENİZ, Nazan DALGIÇ, Elif AKTAŞ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

ÖZ

Amaç: *Büyük bir kısmından viral etkenlerin sorumlu olduğu çocukluk çağı farenjitlerinin, %20-40 kadarında etken A grubu beta-hemolitik streptokoklar (GAS)'dır. Etkenin erken belirlenmesi, viral olgularda gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi, GAS olgularında ise antibiyotik tedavisinin erken başlanması ve böylece komplikasyonların engellenmesi açısından kritik önem taşımaktadır. Duyarlılığı yüksek ve kullanımı kolay hızlı antijen testleri, erken tanı ve uygun tedaviye önemli katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada amaç; boğaz sürüntü örneklerinde GAS tespitinde Bionexia hızlı antijen testinin etkinliğini değerlendirmektir.*

Gereç ve Yöntem: *16 Kasım 2015 - 15 Şubat 2016 tarihlerinde laboratuvarımıza farenjit ön tanısıyla gönderilen 1934 boğaz sürüntüsü değerlendirilmiştir. Örneklere Bionexia Strep-A Plus (BioMérieux, Fransa) hızlı antijen testiyle eşzamanlı kültür yapılmıştır. Tanımlamada basitrasin duyarlılığı, PYR, lateks aglütinasyon testleri ve matriks aracılı lazer dezorpsiyon/iyonizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) kullanılmıştır. Kültürde GAS üreme yoğunluğu kaydedilmiştir.*

Bulgular: *Çalışma 861'i (%44,5) kadın, 1073'ü (%55,5) erkek olmak üzere 1934 hastayla yapılmıştır. Olguların yaşları 1-75 arasında olup, ortalaması 8,7±6,7'dir. Örneklerin 214'i (%11) kültür pozitif, 180'i (%9,3) antijen testi pozitif bulunmuştur. Üreme yoğunluğu daha fazla olan olguların hızlı antijen testi sonuçları anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0,013). Bionexia antijen testinin kültüre göre duyarlılığı %84,1, özgüllüğü %100, pozitif kestirim değeri %100, negatif kestirim değeri %98, testin doğruluğu ise %98,2 olarak saptanmıştır.*

Sonuç: *GAS farenjiti tanısında yüksek duyarlılığa sahip hızlı antijen testlerinin yeğlenmesi, erken tanı ve uygun tedaviye katkı sağlayacağı gibi antibiyotiklerin uygun kullanımı ile direnç gelişiminin önlenmesine de katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte, negatif antijen test sonuçlarının kültürle doğrulanması, yanlış tanı ve eksik tedavinin önlenmesi açısından oldukça önemlidir.*

Anahtar kelimeler: *Boğaz kültürü, GAS, hızlı antijen testi*

ABSTRACT

Use of Bionexia Strep A Plus Rapid Antigen Test in the Identification of Group A Beta-Hemolytic Streptococci in Throat Swab Samples

Objective: *Group A beta-hemolytic streptococci (GAS) are responsible for 20-40% of childhood pharyngitis which are mostly caused by viral agents. Early identification of the agent is crucial in preventing unnecessary use of antibiotics in viral infections and early initiation of antibiotic therapy and prevention of complications in GAS infections. Easy-to-use rapid antigen tests with higher sensitive contribute significantly to early diagnosis and appropriate treatment. The aim of this study is to evaluate the efficacy of Bionexia rapid antigen test in detecting GAS in throat swab samples.*

Material and Methods: *A total of 1934 throat swab samples submitted to our laboratory with a pre-diagnosis of pharyngitis were assessed between 16 November 2015 and 15 February 2016. The samples were simultaneously cultured and tested by rapid Bionexia Strep-A Plus (BioMérieux, France). For identification, bacitracin sensitivity, PYR test and latex agglutination test in addition to Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) were used. The density of GAS growth in the culture was noted.*

Results: *A total of 1934 patients, 861 (44.5%) female and 1073 (55.5%) male cases were included in the study. The ages of the cases ranged between 1, and 75 years (mean: 8.7±6.7 years). Two hundred and fourteen (214; 11%) culture-positive, and 180 (9.3%) rapid antigen-positive samples were detected. Rapid antigen test positivity was significantly higher in denser culture growth (p=0.013). When compared with the corresponding rates culture positivity, Bionexia antigen test has 84.1% sensitivity, 100% specificity, 100% positive predictive, 98% negative predictive values and diagnostic accuracy rate was 98.2%.*

Conclusion: *Preference for a highly sensitive rapid antigen test can contribute significantly to the diagnosis and treatment of pharyngitis, appropriate use of antibiotics and prevention of the spread of resistance. Besides, the confirmation of negative rapid antigen test results by culture is essential to avoid misdiagnosis and insufficient treatment.*

Keywords: *Throat culture, GAS, rapid antigen test*

Alındığı tarih: 07.02.2017
Kabul tarihi: 13.06.2017
Yazışma adresi: Nurcan Saygılı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şişli / İstanbul
e-posta: nrcnsygl@gmail.com

GİRİŞ

Çocukluk çağı farenjit olgularının büyük kısmı viral olmakla birlikte, %20-40'ında grup A streptokoklar (GAS) etkendir[1]. Servikal lenfadenopati, yüksek ateş ve tonsiller eksüda ile karakterize olan GAS farenjiti tanısını, kış mevsiminde akut başlangıç, baş ağrısı ve karın ağrısı gibi faktörlerin varlığı desteklemektedir[2]. Farenjitin akut semptomlarına ek olarak GAS, peritonsiller apse, otit, mastoidit gibi süpüratif komplikasyonlara ve akut romatizmal ateş (ARA), glomerülonefrit gibi süpüratif olmayan komplikasyonlara yol açabilir[3]. Ancak, yalnızca klinik bulgulara dayanarak GAS farenjitini viral farenjitten ayırmak oldukça zordur[2]. Boğaz kültürü, streptokokal farenjit tanısında altın standart metot olarak kullanılmaktadır[4]. Ancak numunenin toplanmasından son mikrobiyolojik teşhise kadar geçen süre oldukça uzun olduğundan, boğaz kültürü yeterince pratik bir yöntem değildir. Sürecin uzun olması hastalığın etkili yönetimini kısıtlamakta, tedavide gecikmeye ya da gereksiz antibiyotik kullanımına neden olmaktadır[3]. Özellikle GAS farenjitine bağlı ARA komplikasyonunun hâlâ önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olduğu ülkelerde, boğaz ağrısı ile gelen hastanın GAS'a bağlı farenjitinin olup olmadığına en kısa sürede karar vermek önemli bir klinik adımdır[5].

Hızlı tanı ve erken antibiyotik tedavisi ile hastalık süresinin kısaltılması, bulaşıcılığın azaltılması ve komplikasyonların önlenmesi olası olmaktadır[6]. Tonsillofarenjitli olgularda etkenin daha hızlı belirlenmesi için hızlı antijen testleri geliştirilmiştir[7]. Hızlı antijen testlerinin 1980'lerin başında kullanıma başlanmasından bu yana çeşitli metodolojik yöntemler geliştirilmiştir. Birinci nesil hızlı antijen testlerinde lateks aglütinasyon, Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA), lateral flow immunoassay (lateral migrasyon immunoassay) ve optik immunoassay yöntemleri kullanılmış, son yıllarda DNA prob, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), floresan in situ hibridizasyon yöntemleri gibi moleküler tabanlı teknikler geliştirilmiştir[8]. Günümüzde en yaygın kullanılan hızlı antijen testleri lateral migrasyon immunoassay veya hızlı immünokromatografik temelli yöntemlerdir[9]. Bu testler streptokokal farenjitin birkaç dk. içinde teşhis edilmesi avantajını, %95'ten fazla özgüllükle sağlarken, duyarlılık %59 ile %96 arasında değişkenlik gösterebilmektedir[3]. Duyarlılığı yüksek bir hızlı antijen testi kullanımı tanıya önemli oranda katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmada amaç, akut tonsillofarenjit ön tanılı hastalarda, boğaz sürüntü örneklerinde GAS tespitinde Bionexia hızlı antijen testinin etkinliğini değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Laboratuvarımıza 16 Kasım 2015-15 Şubat 2016 tarihleri arasında farenjit tanısıyla gönderilen 1934 boğaz sürüntüsü değerlendirilmiştir. İşe girme öncesi muayene, genel tibbi muayene ve rutin çocuk sağlığı muayenesi için gönderilen örnekler dışlanmıştır. Örnekler, BD BBLTM CultureSwabTM EZ II (Le Pont de Claix, Fransa) ikili eküvyon çubukla alınmıştır.

Boğaz sürüntü örneklerinden GAS antijen saptanması için lateral-flow immunoassay temelli Bionexia Strep-A Plus (BioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. Eşzamanlı olarak boğaz kültürü yapılmıştır. İnkübasyon sonrası plaklar beta hemolitik koloni yönünden 24 ve 48 saat sonra değerlendirilmiştir. Üreme varlığında, üreme yoğunluğu (+1)'den (+4)'e derecelendirilmiştir[10]. Gram pozitif ve katalaz negatif koloniler; BD BBLTM DrySlideTM PYR Kit (Becton Dickinson,ABD), lateks aglütinasyon Streptokok Gruplama Test Kiti (Plasmatec, Birleşik Krallık) ve basitrasin duyarlılık (0.04U disk) (Oxoid, Birleşik Krallık) testleri ve Bruker (Daltonics, Almanya) MALDI-TOF MS sistemi kullanıla-

rak tanımlanmıştır. Daha önceden moleküler yöntemle tanımlanmış bir klinik *Streptococcus pyogenes* izolatı kalite kontrolü amacıyla kullanılmıştır[11].

İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, ABD) programı kullanılmıştır. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. Duyarlılık ve özgüllük hesaplamalarında tanı tarama testlerinden yararlanılmıştır. Anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışma 861'i (%44.5) kadın, 1073'ü (%55.5) erkek olmak üzere 1934 hastayla yapılmıştır. Olguların yaşları 1-75 arasında olup, ortalaması 8.7±6.7'dir. Örneklerin, 1625'i acil-çocuk kliniği olmak üzere toplam 1830'u (%94.7) çocuk kliniklerinden, 104'ü (%5.3) erişkin kliniklerinden gönderilmiştir.

Bionexia hızlı antijen testinin kültüre göre duyarlılığı %84.1, özgüllüğü %100, pozitif kestirim değeri %100, negatif kestirim değeri %98, doğruluğu %98.2 olarak saptanmıştır. Kültür ve hızlı antijen testinin karşılaştırmalı sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Kültür sonucu pozitif olan hastaların yaş gruplarına göre dağılımında; 24 hasta 5 yaş altında, 184 hasta 5-15 yaş arasında, altı hasta ise 15 yaş üstü grupta yer almıştır. Beş-on beş yaş grubunda kültür ve hızlı antijen testinin karşılaştırmalı sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Cinsiyetlere göre kültür sonuçlarının dağılımında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Örneklerin 179'unda üreme yoğunluğu (+3) ve (+4), 35'inde (+1) ve (+2) olarak değerlendirilmiştir. Üreme yoğunluğuna göre olguların hızlı antijen testi sonuçları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.013$). Yoğun üreme (+3, +4) görülen olguların hızlı antijen testlerinin pozitif çıkma oranı, az yoğun üreme (+1, +2) görülenlerden anlamlı olarak fazladır. Üreme yoğunluğuna göre olguların Bionexia hızlı antijen testi sonuçlarının değerlendirilmesi Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 1. Kültür-hızlı antijen test sonuçlarının karşılaştırılması.

		Hızlı Antijen Test		
		Pozitif	**Negatif**	**Toplam**
GAS Saptanması	Pozitif	180	34	214
	Negatif	0	1720	1720
Kültür	Toplam	180	1754	1934

GAS, Grup A Streptokok

Tablo 2. Beş-15 yaş kültür-hızlı antijen test sonuçlarının karşılaştırılması.

		Hızlı Antijen Test		
5-15 yaş		**Pozitif**	**Negatif**	**Toplam**
GAS Saptanması	Pozitif	155	29	184
	Negatif	0	1087	1087
Kültür	Toplam	155	1116	1271

GAS, Grup A Streptokok

Tablo 3. Kültür sonucu pozitif olan olgularda farklı üreme yoğunluklarında Bionexia hızlı antijien testinin pozitiflik değerleri ve duyarlılıkları.

Üreme Yoğunluğu	**Hızlı Antijen Testi Pozitif**	**Kültür Pozitif Duyarlılık n (%)**
+1	8	11 (72.7)
+2	17	24 (70.8)
+3	17	23 (73.9)
+4	138	156 (88.5)
Toplam	180	214 (84.1)

Mantel-Haenszel "Linear-By-Linear" ilişkili ki-kare testi; p=0.013

TARTIŞMA

Akut farenjit, özellikle 5-15 yaş grubunda hastane başvurularının en sık nedenlerindendir. Tüm vakaların %30-37'sini bu grup oluştururken, 5 yaş altı çocuklar tüm olguların yalnızca %5-10'undan sorumludur[12]. GAS farenjitleri ile viral farenjitlerin semptomları benzerlik gösterse de yalnız klinik özelliklere bakılarak yapılan tanının duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür[13]. GAS farenjitinde antibakteriyel tedavinin gecik-

meden başlanması süpüratif (peritonsiller apse, otit, mastoidit gibi) ve süpüratif olmayan (ARA, glomerülonefrit gibi) komplikasyonların gelişimini önlerken, klinik semptomların görülme süresi ve bulaş riskini azaltması nedeniyle etkenin GAS olup olmadığına karar vermek önemli bir klinik adımdır[14].

Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Japonya, Avusturalya ve Brezilya'da yapılan sekiz farklı araştırmanın verilerinin incelendiği bir çalışmada, çocuklarda GAS prevalansının %21-%48 (ortalama %36) olduğunu bildirmiştir[15]. Afrika'da yapılan bir çalışmada, GAS prevalansı %22.5 olarak belirlenmiştir[16]. Mısır'da 4-16 yaş arası hastaları kapsayan bir çalışmada ise GAS prevalansı %42.2 olarak bildirilmiştir[17]. Arap ülkelerinde de benzer yüksek prevalans oranlarının (%40-%41.5) bulunduğu çalışmalar yapılmıştır[18,19]. Ülkemizde, 0-18 yaş arası hastaları kapsayan bir çalışmada, GAS prevalansı %25 olarak belirlenmiş, bir başka çalışmada da prevalans benzer şekilde %24.6 bulunmuştur[6,20]. İki ayrı yaş grubu arasında yapılan bir prevalans çalışmasında 0-6 yaş grubunda prevalans %19.4 iken, 7-17 yaş grubunda neredeyse iki katına çıktığı (%35.9) görülmektedir[21]. Laboratuvarımızda daha önce yaptığımız çalışmalarda, GAS farenjiti prevalansı olguların tamamı değerlendirildiğinde %15-15.5, 5-15 yaş arası çocuklarda %18.4-20.5 olarak belirlenmiştir[22,23]. Bu çalışmada ise, GAS farenjiti prevalansı olguların tamamı değerlendirildiğinde %11, 5-15 yaş arası çocuklarda ise %14.4 olarak belirlenmiş ve diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

GAS farenjitinin mikrobiyolojik tanısında boğaz kültürü altın standart yöntemdir. Doğru kişiden, doğru yerden, uygun şekilde alınan örneklerin uygun koşullarda kültürü yapıldığında duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksektir[13]. Boğaz kültürü standart yöntem olmakla birlikte, sonuç için 24-48 saate gereksinim duyulması dezavantaj olarak görülmektedir. Sürecin uzaması tedavide gecikmeye ya da gereksiz antibiyotik kullanımına neden olabilmektedir. Amerika'da tedavileri ayaktan düzenlenen solunum yolu enfeksiyonlu 12 yaş altı hastaların %75'inde antibiyotik kullanıldığı ve bu hastaların büyük çoğunluğunu farenjit tanısı alan 6-12 yaş arası çocukların oluşturduğu rapor edilmiştir[24]. On yedi ülkenin katılımıyla yapılan antibiyotik kullanımına yönelik bir çalışmada, Türkiye'nin en sık antibiyotik kullanımıyla birinci sırada yer aldığı bildirilmiştir. Yalnızca genel antibakteriyel ilaç kullanımında değil, çoğu geniş spektrumlu olan çeşitli antibakteriyel alt gruplarının kullanımı konusunda da Türkiye'nin en ön sırada yer aldığına vurgu yapılmıştır[25]. Türk İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) antibakteriyel ilaç sürveyans 2011 raporu verilerine göre ülkemizde ayaktan tedavi alan hastalarda sistemik olarak tüketilen antimikrobiyal ilaçların toplam tüketim değeri, 46.70 DID (bir günde 1000 kişi başına düşen tanımlanmış günlük doz) olarak hesaplanmış, bunların büyük kısmını 42.28 DID değeriyle antibakteriyel ilaç grubunun oluşturduğu saptanmıştır. Bu değerler ile yalnızca çalışmadaki 17 ülke arasında değil, "European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network" (ESAC-Net) ülkeleri olarak tanımlanan Avrupa ülkelerinin de dâhil olduğu büyük grupta yapılan inceleme ve karşılaştırmalarda da Türkiye'nin antibakteriyel ilaç kullanımında ilk sıralarda yer aldığı gösterilmiştir. Buna örnek olarak, Türkiye'nin DID değerinin ESAC-Net ülkeleri arasında yer alan ve antibakteriyel DID değeri en düşük ülke olan Hollanda'nın yaklaşık 3.5 katı olduğu gösterilmektedir[25,26].

Akut tonsillofarenjitin tanısında yaygın olarak kullanılan hızlı antijen testleri, son 10 yılda antibiyotik reçetelerinde belirgin düşüşe neden olmuştur[27]. İlk olarak 1980'li yıllarda basit bir test olarak geliştirilen bu testlerde ELISA ve lateks aglutinasyon yöntemleriyle, boğaz sürüntüsünden direkt olarak bakteri hücre duvarında bulunan Lancefield A grup spesifik karbonhidratı

saptanmaktaydı[7]. Yapılan bir metaanaliz çalışmasında, lateks aglutinasyon için duyarlılığın %53'e kadar düştüğü belirlenmiştir[3]. Duyarlılıktaki sınırlılık nedeniyle lateks aglutinasyon yöntemi günümüzde daha az yeğlenmektedir. Ayrıca son yıllarda DNA prob, PCR, floresan in situ hibridizasyon yöntemleri gibi moleküler tabanlı teknikler de geliştirilmiştir[9]. Moleküler yöntemlerin ortalama %92 duyarlılık, %99 özgüllük değerleriyle özellikle duyarlılık açısından en iyi performans gösteren testler olduğu ortaya konmuştur[3]. Ancak moleküler yöntemlerin uygulanması diğer yöntemlere oranla daha uzun süre ve daha donanımlı laboratuvar ortamı gerektirmektedir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan hızlı antijen testleri, lateral migrasyon immunoassay ve hızlı immünokromatografik yöntemlere dayalı yeni jenerasyon testlerdir[7]. Bu testler ile yaklaşık 5-10 dk. gibi kısa bir sürede sonuç alınabilmektedir. Böylece hastanın başvurusu sırasında verilen tedavi kararı nesnel kanıtlara dayandırılabilmektedir[28]. Kullanılan her teknik için değerler değişkenlik göstermiş olsa da genel olarak ele alındığında hızlı antijen testlerinin duyarlılığı %83-88, özgüllüğü ise %94-97 olarak belirlenmiştir. Ancak immünokromatografik yöntemlere dayalı hızlı antijen testlerinde duyarlılık %59 ila %96 arasında değişkenlik göstermektedir[3].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, hızlı testler için kullanılan yöntem, ticari kit ve hasta populasyonuna göre değişen duyarlılık ve özgüllük oranları saptanmıştır. Çoban ve ark.[12] beş yıllık bir süreçte Ecotest® strep A hızlı test kiti (Wellkang, İngiltere, Birleşik Krallık) veya SD® hızlı test kiti (Standard Diagnostic, Kore) kullanılarak hızlı antijen tarama testinin duyarlılığını %68.1, özgüllüğü %92.2 bulmuştur. Altun ve ark.[20] 0-18 yaş arası hastalarda Strep A Abon kit (Hangzhou, Çin) kullanarak duyarlılığı %73, özgüllüğü % 96.8 belirlemiştir. Küçük ve ark.[21] 0-6 yaş arası ve 7-17 yaş arası olmak üzere iki grup oluşturmuş, hızlı QuickVue+Strep A Antijen testi (Quidel Corporation, ABD) ile 0-6 yaş grubunda duyarlılığı %58, özgüllüğü %97.2, 7-17 yaş grubunda duyarlılığı %61.5, özgüllüğü %96.9 bulmuştur. Sarıkaya ve ark.[29] da hızlı QuickVue+Strep A Antijen testi (Quidel Corporation, ABD) kullanmış, duyarlılığı %68.2, özgüllüğü %89.7 olarak bildirmiştir. Çamurdan ve ark.[30] INTEX Strep A Test II (INTEX Diagnostika Pharmazeutische Produkte AG, Muttenz, İsviçre) ile duyarlılığı %89.7, özgüllüğü %97.2 şeklinde belirlemiştir. Laboratuvarımızda yapılan maliyet etkinlik değerlendirmesi kapsamında hızlı antijen testleriyle ilgili çeşitli markalar test edilmiştir. Hızlı QuickVue+Strep A Antijen testi (Quidel Corporation, ABD) ile duyarlılık %89.07, özgüllük %99.0, pozitif kestirim değeri %94.2, negatif kestirim değeri %98.02 ve testin doğruluğu %97.46 olarak tespit edilmiştir[22]. Mascia Brunelli hızlı antijen testi (Mascia Brunelli S.p.a, İtalya) ile duyarlılık %75.2, özgüllük %100, pozitif kestirim değerini %100, negatif kestirim değerini %95.81, testin doğruluğu ise %96.28 olarak saptanmıştır[23]. Çalışmamızda, Bionexia hızlı antijen testi değerlendirilmiş ve duyarlılık %84.1, özgüllük %100, pozitif kestirim değeri %100, negatif kestirim değeri %98, testin doğruluğu ise %98.2 olarak saptanmıştır.

Hızlı antijen testinin duyarlılık ve özgüllüğünü etkileyen en önemli faktörlerden biri inokulum miktarıdır[15]. Bir çalışmada, in vitro ortamda GAS'ın çeşitli dilüsyonlarında beş farklı testin duyarlılığı araştırılmış ve inokulum miktarının artmasının test duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir[28]. Çalışmamızda da, üreme yoğunluğu ile olguların hızlı antijen testi pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0.013). Yoğun üreme (3 ve 4) görülen grubun hızlı antijen testi pozitiflik oranı %86.5 iken, üreme yoğunluğu düşük (1 ve 2) saptanan grupta ise pozitiflik oranı %71.4 olarak belirlenmiştir.

Akut tonsillofarenjit olgularında hızlı antijen testlerinin tanıya katkısı oldukça önemlidir. Ancak bu testlerin düşük duyarlılık oranları nedeniyle saptayamadığı olası bir GAS farenjitini atlamamak için, hızlı antijen testi negatif olanlara kültür yapılması çeşitli kılavuzlarda önerilmektedir[10,31]. Her ne kadar Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ARA insidansı 1/100.000 oranla ender olsa da gelişmekte olan ülkelerde 50/100.000'e kadar yükselebilen oranlarla hâlâ kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin başlıca nedenlerindendir[3]. Türkiye geneli için ARA insidansını yansıtan yeterince veri olmasa da Ankara'da 1980 ve 2009 yılları arasındaki ARA hastalarının değerlendirildiği bir çalışmada, insidans 1980-1989 yılları arasında 37/100.000, 1990-1999 yılları arasında 60/100.000 ve 2000-2009 yılları arasında 21/100.000 olarak hesaplanmıştır[32]. Negatif hızlı antijen test sonuçlarının kültürle doğrulanması, yanlış tanı ve eksik tedavinin önlenmesi, böylece ARA gibi önemli komplikasyonların engellenmesi açısından oldukça kritiktir.

Akut tonsillofarenjit olgularında doğrudan kültür ve antibiyotik tedavisi yerine, öncesinde hızlı antijen testlerinin kullanımının daha maliyet etkin bir seçenek olacağı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir[3]. Bir hızlı antijen testinin maliyeti ticari kitler arasında farklılık gösterse de 5-12 TL arasındadır. Hızlı antijen testi negatif olanlara önerilen kültür maliyeti ise GAS şüphesi olmayan olgularda yaklaşık bir kanlı agar maliyeti kadar olup, ortalama 1 TL civarı iken, GAS şüphesi olanlarda ilave testlerle birlikte maliyet ortalama 10-12 TL olmaktadır. GAS farenjitli hastalarda ideal tedavi IV penisilin olmakla birlikte, hasta reçetelerinde sıklıkla oral antibiyotiklerin yer aldığı gözlenmekte, tedavi maliyetinin hızlı antijen testinin maliyetinden daha düşük olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, GAS farenjitli olgularda erken tanı ile hastalık süresinin kısaltılması, bulaşıcılığın azaltılması ve komplikasyonların önlenmesi ile de önemli bir maliyet yükünden kurtulmuş olunmaktadır. Hızlı antijen testlerinin yüksek özgüllük gücü, erken tanı olanağı ve gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi avantajını sunarak akut tonsillofarenjit olgularında maliyet etkin bir yönetimi olası hâle getirmektedir[3].

Gereksiz antibiyotik kullanımı, antibiyotiğe bağlı yan etkilerin görülmesi ve tedavi maliyetini arttırmasından öte, antibiyotiğe dirençli enfeksiyonların ortaya çıkmasını kolaylaştırması açısından kritik öneme sahiptir. Ciddi dirençli bakteriyel enfeksiyon nedeniyle, her yıl yalnızca Avrupa'da yaklaşık 25.000 hasta ölmektedir. Ayrıca çok ilaca dirençli bakterilerin, Avrupa'da her yıl 1.5 milyar Euro'dan fazla bir ekonomik zarara neden olduğu tahmin edilmektedir[33]. "Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance" (CAESAR) 2014 raporunda, ülkemizde özellikle enterik bakterilerde genel olarak antibakteriyal direnç oranlarının yüksek olduğu belirtilmiştir[34]. Sürveyans verilerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda 2012 yılı invaziv *Escherichia coli* izolatlarının GSBL pozitiflik oranı %42.50 olarak belirlenirken, bu oranın 2013 yılı sürveyans verilerinde %44.90'a yükseldiği belirlenmiştir. Avrupa ülkelerinin direnç verilerinin rapor edildiği Avrupa Antimikrobiyal Direnç Surveyans Ağı (EARS-Net) 2013 Raporu ile Ulusal Antimik-robiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) 2013 Sürveyans verileri birlikte değerlendirildiğinde; EARS-Net 2013 raporunda invaziv *E. coli* izolatlarında aminopenisillinlere direnç oranı Avrupa ortalaması %57.80 olarak belirlenirken, ülkemiz verilerinde bu oran %70.70 olarak belirlenmiştir. Ayrıca EARS-Net 2013 raporunda üçüncü kuşak sefalosporinler için Avrupa ortalaması ise %12.60 olarak bildirilmiş, Türkiye'de ise %40.15 olarak belirlenmiştir. Bu oranın diğer Avrupa ülke verileri ile kıyaslandığında çok yüksek olarak belirlenmesi ülkemizde antibiyotik kullanım politikaları açısından yeni düzenlemelerin yapılması gerekliliğini ortaya

koymaktadır[35]. Akut farenjit olgularında hızlı antijen testlerinin kullanımı, reçete edilen antibiyotik oranlarını düşüreceğinden, direnç gelişimini önlemede kritik bir adımdır.

Çalışmamızın güçlü yönleri, literatürdeki pek çok çalışma ile karşılaştırıldığında yüksek sayıda örnek ile çalışılmış olması ve çalışılan bütün örneklere eş amanlı altın standart yöntem olan kültür de yapılarak hızlı antijen testinin yalancı pozitiflik yönünden de değerlendirilmesi ile "Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies" (QUADAS) kriterlerine göre kalite standartlarını karşılamış olmasıdır[36]. Ancak elektronik reçete yazılımının tam olarak uygulanamamış olması hastaların antibiyotik kullanımı takibini güçleştirmiş, buna bağlı olarak testin antibiyotik kullanımının azaltılmasına etkisinin sayısal olarak gösterilememiş olması çalışmamızdaki kısıtlılığı oluşturmuştur.

Sonuç olarak, GAS farenjiti tanısında yüksek duyarlılığa sahip hızlı antijen testlerinin kullanımı, erken tanı ve uygun tedaviye katkı sağlamaktadır. Kliniklere başvurusu sırasında pozitif sonuç alınan hastalara erken antibiyotik tedavisi başlanabilecek, hastalık süresinin kısaltılıp bulaşıcılığın azaltılması yanında ülkemizde hâlâ önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan, ARA gibi komplikasyonların önlenmesi olası olacaktır. Negatif sonuç alınan hastalarda ise gereksiz antibiyotik kullanımı engellenerek, önemli bir sorun olan direnç gelişiminin önlenmesine de katkı sağlanmış olacaktır. Bununla birlikte, hızlı antijen test sonucu negatif olduğunda kültür yapılması, yanlış tanı ve eksik tedaviyi önleyecek, GAS farenjitli olguların klinik yönetimi daha güçlü hâle gelecektir.

KAYNAKLAR

1. **Cohen J F, Chalumeau M, Levy C, et al.** Spectrum and inoculum size effect of a rapid antigen detection test for group A streptococcus in children with pharyngitis. *PLoS One* 2012; 7:e39085. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039085
2. **Ji MJ, Noh JS, Cho BK, Cho YS, Kim SJ, Yoon BS.** Evaluation of SD BIOLINE Chagas Ab rapid kit. *Korean J Lab Med* 2009; 29:48-52. https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.48
3. **Lean WL, Arnup S, Danchin M, Steer AC.** Rapid diagnostic tests for group A streptococcal pharyngitis: A meta-analysis. *Pediatrics* 2014; 134:771-81. https://doi.org/10.1542/peds.2014-1094
4. **Maltezou HC, Tsagrid V, Antoniadou A, et al.** Evaluation of a rapid antigen detection test in the diagnosis of streptococcal pharyngitis in children and its impact on antibiotic prescription. *J Antimicrob Chemother* 2008, 62:1407-12. https://doi.org/10.1093/jac/dkn376
5. **Bisno AL.** Primary care: Acute pharyngitis. *N Engl J Med* 2001; 344:205-11. https://doi.org/10.1056/NEJM200101183440308
6. **Gözüküçük R, Göçmen İ, Nas Y, Yılmazer F, Ünüvar E.** Streptokoksik tonsillofarenjit tanısında strep-A hızlı testinin etkinliği. *Çocuk Dergisi* 2011; 11:157-9.
7. **Cohen JF, Bertille N, Cohen R, Chalumeau M.** Rapid antigen detection test for group A *streptococcus* in children with pharyngitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 7:CD010502. https://doi.org/10.1002/14651858.CD010502.pub2
8. **Öngen B.** A Grubu streptokok infeksiyonlarında tanı. *ANKEM Derg* 2004; 18:45-50.
9. **Winn WC, Hall GS, Allen DS, et al.** Gram-Positive Cocci Part II: *Streptococci, Enterococci* and the *Streptococcus*-like bacteria. Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology (7th). Lipincott Williams an Wilkins 2015:733-843.
10. **Church DL.** Aerobik Bakteriyoloji. (eds.) Garcia LS, Isenberg HD. Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El kitabı. 3. Baskı. 2007 Güncellemesi. Bölüm: 3.
11. **Kolukirik M, Yılmaz M, Ince O, Ketre C, Tosun AI, Ince BK.** Development of a fast and low-cost qPCR assay for diagnosis of acute gas pharyngitis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; 15:46. https://doi.org/10.1186/s12941-016-0162-0
12. **Çoban B, Kaplan H, Topal B, Ülkü N.** The sensitivity and the specifity of rapid antigen test in Group A streptococcal tonsillopharyngitis. *J Pediatr Inf* 2013; 7:143-6. https://doi.org/10.5152/ced.2013.1533
13. **Van Brusselen D, Vlieghe E, Schelstraete P, et al.** *Streptococcal pharyngitis* in children: to treat or not to treat? *Eur J Pediatr* 2014; 173:1275-83. https://doi.org/10.1007/s00431-014-2395-2
14. **Llor C, Madurell J, Balagué-Corbella M, Gómez M, Cots JM.** Impact on antibiotic prescription of rapid antigen detection testing in acute pharyngitis in adults: a randomised clinical trial. *Br J Gen Pract* 2011; 61:e244-51. https://doi.org/10.3399/bjgp11X572436
15. **Cohen JF, Cohen R, Levy C, et al.** Selective testing strategies for diagnosing group A streptococcal infection in children with pharyngitis: a systematic review and prospective multicentre external validation study. *CMAJ* 2015; 187:23-32. https://doi.org/10.1503/cmaj.140772
16. **Gonsu HK, Bomki CM, Djomou F, et al.** A comparative study of the diagnostic methods for Group A strep-

tococcal sore throat in two reference hospitals in Yaounde, Cameroon. *Pan Afr Med J* 2015; 20:139. https://doi.org/10.11604/pamj.2015.20.139.4810

17. **Abd El-Ghany SM, Abdelmaksoud AA, Saber SM, Abd El Hamid DH.** Group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis and carriage rate among Egyptian children: A case-control study. *Ann Saudi Med* 2015; 35:377-82. https://doi.org/10.5144/0256-4947.2015.377
18. **Ba-Saddik IA, Munibari AA, Alhilali AM, et al.** Prevalence of Group A beta-haemolytic *Streptococcus* isolated from children with acute pharyngotonsillitis in Aden, Yemen. *Trop Med Int Health* 2014; 19:431-9. https://doi.org/10.1111/tmi.12264
19. **Telmesani AM, Ghazi HO.** A study of group a streptococcal bacteria isolation from children less than 12 years with acute tonsillitis, pharyngitis and healthy primary school children. *J Family Community Med* 2002; 9:23-6.
20. **Altundağ Altun H, Meral T, Türk Arıbaş E.** The specificity and sensitivity results of the rapid antigen test used in the diagnosis of group a beta hemolytic *Streptococcal tonsillopharyngitis*. *Acta Medica Mediterr* 2015; 31:287-90.
21. **Küçük Ö, Biçer S, Giray T, et al.** Validity of rapid antigen detection testing in group a beta-hemolytic streptococcal tonsillopharyngitis. *Indian J Pediatr* 2014: 81:138-42. https://doi.org/10.1007/s12098-013-1067-y
22. **Deniz R.** Boğaz sürüntü örneklerinde A grubu beta-hemolitik streptokokların tespitinde hızlı antijen testi ve matriks aracılı lazer desorbsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresinin (MALDI-TOF MS) kullanımı [Tıpta uzmanlık tezi]. İstanbul: Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2016.
23. **Barış A, Anlıaçık N, Bulut ME, Deniz R, Yücel E, Aktaş E.** A Grubu Beta-hemolitik streptokok farenjiti tanısında Mascia Brunelli hızlı antijen testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51:73-8. https://doi.org/10.5578/mb.43448
24. **Vaz LE, Kleinman KP, Raebel MA, et al.** Recent trends in outpatient antibiotic use in children. *Pediatrics* 2014; 133:375-85. https://doi.org/10.1542/peds.2013-2903
25. **Versporten A, Bolokhovets G, Ghazaryan L, et al.** Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. *Lancet Infect Dis* 2014; 14:381-7. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70071-4
26. Ulusal Antibakteriyel İlaç Sürveyansı -2011, Sağlık Bakanlığı, Ankara 2015: 995.
27. **Gazzano V, Berger A, Benito Y, et al.** Reassessment of the role of rapid antigen detection tests in diagnosis of invasive group A streptococcal infections. *J Clin Microbiol* 2016; 54:994-9. https://doi.org/10.1128/JCM.02516-15
28. **Lasseter GM, McNulty CA, Richard Hobbs FD, Little P; PRISM Investigators.** In vitro evaluation of five rapid antigen detection tests for group A beta-haemolytic streptococcal sore throat infections. *Fam Pract* 2009; 26:437-44. https://doi.org/10.1093/fampra/cmp054
29. **Sarikaya S, Aktaş C, Ay D, Cetin A, Celikmen F.** Sensitivity and specificity of rapid antigen detection testing for diagnosing pharyngitis in the emergency department. *Ear Nose Throat J* 2010; 89:180-2.
30. **Camurdan AD, Camurdan OM, Ok I, Sahin F, Ilhan MN, Beyazova U.** Diagnostic value of rapid antigen detection test for *Streptococcal pharyngitis* in a pediatric population. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 2008; 72:1203-6. https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2008.04.008
31. **Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, et al.** Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A *Streptococcal pharyngitis*: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2012; 55:1279-82. https://doi.org/10.1093/cid/cis847
32. **Orün UA, Ceylan O, Bilici M, et al.** Acute rheumatic fever in the Central Anatolia Region of Turkey: a 30-year experience in a single center. *Eur J Pediatr* 2012; 171:361-8. https://doi.org/10.1007/s00431-011-1555-x
33. http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/data-and-statistics. (Erişim tarihi: 07.02.2017).
34. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/285405/CAESAR-Surveillance-Antimicrobial-Resistance2014.pdf?ua=1. (Erişim tarihi: 07.02.2017).
35. TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı - Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2013 Yıllık Raporu, 2014.
36. **Macaskill P, Gatsonis C, Deeks J, et al.** Cochrane handbook for systematic reviews of diagnostic test accuracy. Version 0.9.0. Londra: The Cochrane Collaboration 2010.

Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(3):146-150, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.146

Olgu

Seyrek İzole Edilen Bir Etken: *Listeria monocytogenes*

Zeynep AYAYDIN*, Gülseren SAMANCI AKTAR*, Arzu RAHMANALI ONUR*, Demet GÜR VURAL, Hakan TEMİZ***

**Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır*
***Gebze Fatih Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kocaeli*

ÖZ

Listeria monocytogenes genelde zoonotik bir enfeksiyon etkenidir. Yaşlılar veya hücresel bağışıklığın zayıfladığı predispozan koşulları bulunan hastalarda enfeksiyon oluşturabilen önemli bir patojendir. L. monocytogenes'in yaşlı ve immün sistemi baskılanmış hastalarda bakteriyemi etkeni olabileceğinin akılda tutulması gerekliliğini vurgulamak amacıyla bu olgu sunulmuştur. Hastanemize yatışından dört ay önce demir eksikliği anemisi tanısı almış olan 89 yaşındaki hasta, Dahiliye Servisi'ne yatırıldıktan sonra laboratuvarımıza kan kültürleri gönderilmiştir. Bu kan kültürlerinde katalaz pozitif, oksidaz negatif, kokobasil görünümünde gram pozitif bakteri üremiştir. İzole edilen suş konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistem (VITEK-2, bioMérieux, Fransa) ile L. monocytogenes olarak tanımlanmıştır. Cihaz tarafından L. monocytogenes olarak tanımlanan suş, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiş ve bu merkezde Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) Kütle Spektrometre yöntemi ile tür düzeyinde doğrulanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile yapılan duyarlılık çalışmasında, antibiyotiklerin çoğuna duyarlı bulunan suşun siprofloksasin ve levofloksasine orta derecede duyarlı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, L. monocytogenes'in nadir bir bakteriyemi etkeni olduğu bilinmesine rağmen, olgumuzda da görüldüğü gibi yaş faktörü, malignite veya altta yatan kronik bir hastalığın varlığının Listeria benzeri enfeksiyonlara yatkınlığı arttırabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Kan ve BOS bulguları ile seyreden her türlü menenjit olgusunda da L. monocytogenes'in akılda tutulması ve ampirik tedavi planlamasının buna göre yapılması gerekliliğini vurgulamak yerinde olacaktır.

Anahtar kelimeler: *İmmünsüpresyon, bakteriyemi, Listeria monocytogenes*

ABSTRACT

A Rarely Isolated Pathogen: Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes is usually a zoonotic infectious agent. It is an important pathogen that may cause infection in the elderly or in immunocompromised patients with predisposing conditions. The present case is presented to underline the necessity of keeping in mind that L. monocytogenes can be the cause of bacteremia in geriatric and immunocompromised patients. An 89-year-old patient, who was diagnosed as iron deficiency anemia four months before hospitalization, was hospitalized in the Internal Medicine Clinic and his blood samples were transferred to our laboratory for blood culture. Growth of catalase-positive, oxidase-negative gram-positive bacteria in the morphology of coccobacillus was observed in the blood culture. The isolated strain was identified as L. monocytogenes using the conventional methods and the automated system (VITEK 2, bioMérieux, France). The strain identified as L. monocytogenes by device was transferred to the Marmara University Pendik Training and Research Hospital Microbiology Laboratory and the bacterial identification was confirmed at the species level using Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) with mass spectrometer method in this center. In the susceptibility testing performed by disk diffusion method, it was established that the strain was found susceptible to most of the antibiotics and moderately susceptible to ciprofloxacin and levofloxacin. In conclusion, although L. monocytogenes is known as a rare cause of infection, it should be considered that factors such as age, malignancy or underlying chronic disease may enhance the tendency for listeriosis-like infections, as was observed in the present case. It would be reasonable to underline the necessity of keeping L. monocytogenes in mind in any meningitis case manifesting blood and cerebrospinal (CSF) signs and of planning the empirical therapy accordingly.

Keywords: *Immune suppression, bacteremia, Listeria monocytogenes*

Alındığı tarih: 03.03.2017
Kabul tarihi: 28.06.2017
Yazışma adresi: Demet Gür Vural, Gebze Fatih Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kocaeli
e-posta: demet.gur@yandex.com

GİRİŞ

Listeria cinsi üyeleri spor oluşturmayan, dallanmayan, düzgün, kısa, tek tek ya da kısa zincirler hâlinde görülen Gram pozitif basillerdir. *Listeria* türleri fakültatif anaeropturlar. Sahip olduğu 1-5 adet peritrih kirpikleri ile 28°C'de hareketliyken 37°C'de hareketi zayıflar. Katalaz oluştururlar. Oksidaz testi negatiftir. Gebe olmayan erişkinlerde *L. monocytogenes* özellikle menenjit, ensefalit ve/veya septisemiye yol açar. Yaşlılar veya hücresel bağışıklığın zayıfladığı organ nakli, lenfoma gibi predispozan koşulları bulunan kişiler özellikle duyarlıdırlar. Bazı ender durumlarda ise hastaların bilinen predispozan faktörleri bulunmamaktadır[1]. Çalışmamızda demir eksikliği tanısı almış olan, hâlsizlik yakınması nedeniyle hastanemiz Dâhiliye Servisi'ne yatırılan 89 yaşındaki erkek hastanın kan kültürlerinde üreyen *L. monocytogenes* olgusu sunulmuştur.

OLGU

Çalışmamızda, hastanemize yatışından dört ay önce demir eksikliği anemisi tanısı alan, hâlsizlik ve yorgunluk yakınmalarının olması üzerine anemi nedeniyle Dâhiliye Servisi'ne yatırılan 89 yaşındaki hastanın sağ ve sol kol kan kültürlerinde üreyen *L. monocytogenes* olgusu sunulmuştur. *L. monocytogenes*'in genellikle in-vitro koşullarda penisilin, ampisilin, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin, rifampin ve kloramfenikole duyarlı, fakat kinolonlara kısmen duyarlı olduğu, bazı klinik kökenlerde kloramfenikol, makrolidler ve tetrasikline karşı direnç plazmidlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Sefalosporinler in-vitro testlerde hassasiyet gösterebilse de in-vivo olarak etkisizdirler[1]. Amacımız, bazı predispozan faktörlere sahip hastaların klinik örneklerinden izole edilebilen *L. monocytogenes*'in bu antibiyotiklere duyarlılık paterninin belirlenmesi, aynı zamanda linezolid, daptomisin gibi antibiyotiklere karşı duyarlılığının araştırılmasıdır.

Hastanemize başvurusundan dört ay önce demir eksikliği anemisi tanısı almış olan, hâlsizlik ve yorgunluk yakınmaları nedeniyle 15.06.2015 tarihinde Acil Servisimize başvuran 89 yaşındaki hasta, anemi nedeniyle replasman tedavisi için Dâhiliye Servisi'ne yatırılmıştır. Etiyolojiye yönelik endoskopi önerilmiş fakat hasta kabul etmemiştir. Hastanın hemoglobin değeri 8.92 g/dl, eritrosit sayım değeri 2.98 10^6/ml, hematokrit değeri 26.5% (Mindray BC 6800, Çin) bulunmuştur. Gelişen ateş yüksekliği nedeniyle bakteriyemi bulguları gösteren hastanın, 16.06.2015 tarihinde sağ ve sol kol kan kültürü örnekleri alındıktan sonra ampirik olarak intravenöz seftriakson tedavisine başlanmıştır. Laboratuvarımıza gönderilen kan örnekleri BD (Becton Dickinson) Bactec 9120 (Roche, ABD) otomatize kan kültürü cihazına yüklenmiştir. Cihazda 18.06.2015 tarihinde pozitif sinyal veren kan kültürlerinden %5 koyun kanlı agar, Eozin Metilen Blue Agar ve Saburoud Dekstroz Agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Kanlı besiyerinde üreyen, gram pozitif basil görünümünde, katalaz pozitif, oksidaz negatif koloniler VITEK-2 (bioMérieux, Fransa) identifikasyon cihazına yüklenmiştir. Cihaz tarafından *L. monocytogenes* olarak tanımlanan suş, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiş ve bu merkezde Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) Kütle Spektrometre yöntemi ile doğrulanmıştır. Bu kolonilerden hareket besiyeri ile yapılan hareket testi ile, bakterinin hareketinin 25 derecede hızlı iken, 37 derecede hareketinin yavaşladığı görülmüştür. Standart *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu ile CAMP testi pozitif olarak saptanmıştır.

Listeria kolonilerinden CLSI (Clinical And Laboratory Standarts Institute) standartları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır.

Antibiyogram sonuçlarına göre bakteri penisilin, ampisilin, gentamisin, amikasin, eritromisin, klaritromisin, azitromisin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, kloramfenikol, tetrasiklin, linezolid ve daptomisine duyarlı, siprofloksasin ve levofloksasine orta duyarlı bulunmuştur. Tedavide daha çok penisilin veya ampisilin ve/veya bir aminoglikozid kombinasyonunun kullanıldığı *L. monocytogenes*'in çalışmamızda da duyarlılık paterninin değişmediği göze çarpmaktadır.

Kan kültürlerinde *L. monocytogenes* ürettiğimiz hastanın antibiyogram sonucu klinisyene bildirilmiştir. Fakat kültür sonuçları çıkmadan hastanın kendi isteği nedeniyle 18.06.2015 tarihinde taburcu edildiği öğrenilmiştir.

TARTIŞMA

Listeria monocytogenes birçok çevresel kaynaktan ve memelilerin dışkılarından izole edilebilen Gram pozitif bir bakteridir. Her ne kadar doğada yaygın dağılım gösterse de hastalık insidansı yenidoğanlar, yaşlılar, gebeler ve hücresel bağışıklık sisteminde ciddi defektleri olanlar (Örneğin, lenfomalar, AİDS ve transplant hastaları) gibi yüksek riskli gruplarda daha fazladır[2]. Sepsis, menenjit ve neonatal enfeksiyon gibi çeşitli klinik tablolara neden olabilir. Tedavide ampisilin, penisilin-G ve gentamisin genellikle tek başına veya kombine edilerek verilebilir. Yaşlı ve immünsüprese hastalarda mortalite yüksek olabilmektedir. Predispozan faktörleri olmayanlarda genellikle iyi seyirlidir[3]. Böylece çeşitli predispozan faktörler nedeniyle bağışıklığı zayıflamış hastalar ve diğer riskli gruplarda *L. monocytogenes*'in enfeksiyona neden olabileceği düşünülmelidir. Olgumuzda demir eksikliği anemisi varlığı ve yaş faktörü nedeniyle immünite zayıflığı göze çarpmaktadır.

Ağuş ve ark.[4], kronik lenfosittik lösemi (KLL) tanısı almış ve kemoterapi uygulanmış bir hastada *L. monocytogenes*'e bağlı sepsis olgusu bildirmişlerdir. Bu olguda hematolojik malignite ve kemoterapi uygulaması belirgin risk faktörleridir.

Tekay ve ark.[5], neonatal sepsis tanısı alan, düşük doğum ağırlıklı kız bebeğin kan kültürlerinde üreyen *L. monocytogenes*'e bağlı sepsis olgusu bildirmişlerdir. Bu olguda, *L. monocytogenes* yenidoğan gibi hücresel bağışıklık yetmezliği olan hastalarda neonatal sepsise neden olabilmektedir. Bu olguda izole edilen *L. monocytogenes* penisilin, ampisilin, eritromisin, trimetoprim-sulfametoksazole duyarlı bulunmuştur. Olgumuzda da suşumuzun bu antibiyotiklere duyarlı olduğu görülmüştür.

Aktaş ve ark.[6], sol akciğerde pleomorfik karsinomu ve febril nötropenisi olan 49 yaşındaki kadın hastada, *L. monocytogenes*'e bağlı sepsis olgusu bildirmişlerdir. Maligniteye bağlı tadavi sonrası nötropeni gelişimi, *L. monocytogenes* enfeksiyonu için risk faktörü oluşturmaktadır. Hastanın kan kültüründen üreyen *L. monocytogenes* gentamisin, amikasin, eritromisin ve trimetoprim-sulfametoksazole duyarlı bulunmuştur. İzole ettiğimiz suşumuz da benzer duyarlılığa sahiptir.

Çelik ve ark.[7], metastatik meme karsinomlu, kemoterapi sonrası Onkoloji Kliniği'ne yatırılan hastada yatışının 2. gününde kateterle ilişkili *L. monocytogenes* bakteremisi olgusu bildirmişlerdir. Çalışmada, predispozan faktörler olarak malignite öyküsü ve kemoterapiye bağlı bağışıklık zayıflığı dikkati çekmektedir.

Doğan ve ark.[8], Öztürk ve ark.[9], Oğuz ve ark.[10], Vardar ve ark.[11], Külcü ve ark.'nın[12] çalışmalarında *L. monocytogenes*'e bağlı gelişen menenjit infeksiyonlarında bulguların ya tek başına ya da bakteriyemi bulguları ile birlikte olduğu görülmektedir.

Doğan ve ark.[8], folliküler lenfomalı, kronik böbrek yetmezliği olan 61 yaşındaki kadın hastada *L. monocytogenes*'e bağlı menenjit ve bakteriyemi olgusu bildirmişlerdir. Bu olgunun kan ve beyin omurilik sıvısından (BOS) *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Bakteri, olgumuzdaki gibi ampisilin, eritromisin, penisilin, trimetoprim-sulfametoksazole duyarlı bulunmuştur. Çalışmada, yaş faktörü, malignite ve altta yatan kronik hastalık varlığı dikkat çekmektedir. *L. monocytogenes* ender bir menenjit etkeni olmasına rağmen, yatkınlığı olan hastalarda menenjit etkenleri arasında olabileceği düşünülerek dikkate alınmalıdır.

Öztürk ve ark.[9], prematüre biri kız ve diğeri erkek iki hastada sepsis ve menenjit tanısı ile *L. monocytogenes*'e bağlı neonatal enfeksiyon olgularını bildirmişlerdir. Bu hastaların kan kültürlerinde *L. monocytogenes* üretmişlerdir. Bu çalışmada, hastaların prematür oluşlarının *Listeria* infeksiyonlarına yatkınlığı arttırdığına dikkat çekilmiştir.

Oğuz ve ark.[10], prematür bebekte doğum sonrası 11. günde neonatal sepsis ve menenjit tanısı ile *L. monocytogenes*'e bağlı gelişen neonatal enfeksiyon olgularını bildirmişlerdir. Bu olguda da görüldüğü gibi hastanın prematür oluşu, *L. monocytogenes* infeksiyonu açısından predispozan faktör olarak göze çarpmaktadır.

Vardar ve ark.[11], 78 yaşındaki erkek hastada *L. monocytogenes*'e bağlı bir menenjit olgusu bildirmişlerdir. Bu hastada, *Listeria* infeksiyonlarına yatkınlığı arttıran yaş faktörü dikkati çekmektedir.

Külcü ve ark.[12], 18 aylık erkek hastada *L. monocytogenes*'e bağlı bir menenjit olgusu bildirmişlerdir. Hastanın kan ve BOS kültürlerinde *L. monocytogenes* üretilmiş, bakteri ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere dirençli, ampisilin, amoksisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, vankomisin, aminoglikozid, kinolon ve makrolidlere duyarlı bulunmuştur. İzole ettiğimiz suşumuzun da aynı duyarlılık paternini gösterdiği bulunmuştur.

Yılmaz ve ark.[13], hastaneye yatışından yaklaşık bir ay önce polimiyozit nedeniyle kortikosteroid tedavisi alan, aynı zamanda CMV'e bağlı hepatiti olan 29 yaşındaki erkek hastada *L. monocytogenes*'e bağlı bir meningoensefalit olgusu sunmuşlardır. Hastanın kan ve BOS kültürlerinde *L. monocytogenes* üretilmiştir. Bu olguda da hastanın kortikosteroid tedavisi nedeniyle humoral ve hücresel bağışıklığının baskılanmasının, *L. monocytogenes* infeksiyonları açısından predispozan faktör olduğu göze çarpmaktadır.

Midi ve ark.[14], interstisyel pnömoni nedeniyle yüksek dozda steroid tedavisi almış 56 yaşındaki erkek hastada *L. monocytogenes*'e bağlı beyin absesi olgusu bildirmişlerdir. Bu olguda *Listeria* enfeksiyonuna zemin hazırlayan predispozan faktör olarak yüksek dozda steroid kullanımı dikkati çekmektedir.

Listeria monocytogenes enfeksiyonları yenidoğanlar, yaşlılar, gebeler ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde oldukça sık oranda görülmesine rağmen, genel popülasyonda sağlıklı insanlarda ender olarak karşımıza çıkmaktadır. Ender de olsa bu tür olgularla yapılan çalışmalar mevcuttur.

Eminoğlu ve ark.[15], daha önce hiçbir yakınması olmayan, immün yetmezlik saptanmayan ve BOS kültüründe *L. monocytogenes* izole edilen 9 yaşında bir olgu sunmuşlardır. Bu olguda *Listeria* enfeksiyonu açısından herhangi bir predispozan faktörün mevcut olmaması dikkati çekmektedir.

Aksoy ve ark.[16], tarafından, daha önceden sağlıklı olduğu bilinen 7 yaşındaki bir erkek hastada,

L. monocytogenes'e bağlı menenjit olgusu bildirilmiştir. Bu olgunun kan kültüründe üreme saptanmamışken, BOS kültüründen *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Bu olguda da, *Listeria* enfeksiyonuna zemin hazırlayan herhangi bir faktör mevcut değildir.

Bıçakcı ve ark.[17], tarafından yapılan çalışmada, çocuk olgular dışında, *Listeria* infeksiyonu açısından herhangi bir predispozan faktöre sahip olmayan 50 yaşında bir kadın hastada *L. monocytogenes*'e bağlı menenjit olgusu bildirilmiştir. Bu olgunun alınan kan ve BOS kültürlerinde L. monocytogenes üretilmiştir.

Sonuç olarak, *L. monocytogenes*'in ender bir bakteriyemi etkeni olduğu bilinmesine rağmen, olgumuzda da görüldüğü gibi yaş faktörü, malignite ve altta yatan kronik bir hastalık varlığının *Listeria* benzeri enfeksiyonlara yatkınlığı arttırabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca yaş faktörü dikkate alınmaksızın, *L. monocytogenes*'e bağlı menenjit olgularının yalnızca çeşitli predispozan faktörlere sahip kişilerde görülmeyebileceği, kan ve BOS bulguları ile seyreden her türlü menenjit olgusunda da *L. monocytogenes*'in akla gelmesi gerektiğine vurgu yapmak yerinde olacaktır. Böylece menenjit ve benzeri enfeksiyonlarda *L. monocytogenes* de düşünülerek ampirik tedavinin planlanmasının yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. **Bille J.** *Listeria* ve erysipelothrix. In: Murray RP, Baron JE, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller AM, eds. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: ASM Press, 2007: 474-9.
2. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** Listeria ve Erysipelothrix "Çeviren Güney M, Çeviri Editörü: Başustaoğlu AC: Tıbbi Mikrobiyoloji, 6. baskı", Ankara: Atlas Kitapçılık Tic Ltd Şti, 2010: 255-8.
3. **Evirgen Ö.** *Listeria monocytogenes* infeksiyonu. kliniği, tanı ve tedavi özellikleri. *Van Tıp Derg* 2005; 12:32-5.
4. **Ağuş N, Yılmaz N, Medeni SŞ, Kuzucu L, Akgüre N.** *Listeria monocytogenes*'e bağlı sepsis: Bir olgu sunumu. *ANKEM Derg* 2013; 27:80-2. https://doi.org/10.5222/ankem.2013.080
5. **Tekay F, Özbek E, Kazancı E, Okur N, Demirel M, İpek ŞM.** *Listeria monocytogenes* serotip 4b'ye bağlı neonatal sepsis: Bir olgu ve literatür derlemesi. *Dicle Med J* 2014; 41:599-602. https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2014.03.0483
6. **Aktaş Z, Akman A, Bal Ç.** *Listeria monocytogenes*'e bağlı sepsis: Bir olgu sunumu. *İnfek Derg* 2005; 19:471-5.
7. **Çelik F, Erdoğan PA, Aydemir Ş, Uslu RF, Sipahi RO.** Levofloksasin ile tedavi edilen bir *Listeria monocytogenes* bakteremi olgusu. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob* 2014; 3:10.
8. **Doğan M, Taşbent EF, Feyzioğlu B, Baykan M.** *Listeria monocytogenes*'in etken olduğu bir menenjit ve bakteriyemi olgusu. *ANKEM Derg* 2014; 28:114-8.
9. **Öztürk A, Hallaç Kİ, Öztürk M, Sümerkan B, Kurtoğlu S.** Neonatal listeriyozis: İki olgu raporu. *Mikrobiyol Bul* 1995; 29:299-303.
10. **Oğuz SŞ, Kızılelma A, Erdeve Ö ve ark.** *Listeria monocytogenes* serotip 1/2b'ye bağlı neonatal menenjit olgusu. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:541-5.
11. **Vardar İ, Yurtsever GS, Coşkun AN, Kaptan F, El S, Ural S.** *Listeria monocytogenes*'e bağlı bir menenjit olgusu. *ANKEM Derg* 2011; 25:54-7. https://doi.org/10.5222/ankem.2011.54
12. **Külcü UN, Say A, Güven F, Deniz E, Yekeler E, Nalbantoğlu B.** Merkezi sinir sistemini etkileyen *Listeria monocytogenes* enfeksiyonu. *Çocuk Enf Derg* 2010; 4:82-5.
13. **Yılmaz G, Arslan A, Yalçı A, Us E, Çalgın K, Kurt H.** *Listeria meningoencephalitis* concurrent with CMV hepatitis. *Nobel Med* 2013; 9:136-8.
14. **Midi İ, Ekinci G, Yaroğlu S, Aktan S.** *Listeria monositogenez*'e bağlı beyin absesi: Olgu sunumu. *Fırat Tıp Derg* 2005; 10:36-9.
15. **Eminoğlu TF, Küçükçongar A, Yılmaz BF, Aktaş A, Hasanoğlu A.** Dokuz yaşındaki kız hastada *Listeria* menenjiti. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2008; 17:183-5.
16. **Aksoy A, İncili İ, Erduran E, Tosun İ.** *Listeria monocytogenes* menenjit olgusu. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2009; 18:235-9.
17. **Bıçakcı Ş, Kibar F, Özeren A, Bıçakcı K, Özcan F, Saltoğlu N.** İmmun baskılanmış durumu olmayan bir olguda nörolisteriyozis. *Türkiye Klinikleri J Neur* 2008; 3:13-7.

YAZARLARA BİLGİ

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

Başvuru

- Sadece on-line başvurular kabul edilir.
- Başvurularda, tüm yazarların adları ve adresleri, açık olarak yazılmalıdır. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve teklif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak veya posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.
- İnsanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalarla ilgili olarak etik kurulların onaylarının ve gönüllülerden alınmış yazılı onam formlarının da on-line olarak ve posta ile aşağıdaki adrese gönderilmesi zorunludur.

Prof. Dr. Çağrı Ergin
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Kınıklı Kampüsü / Denizli
Tel: 0258 296 2491
E-posta: tmcdeditor@gmail.com

Metin Çeşitleri

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

Metin yazımı esnasında uyulacak kurallar

- Yazının Türkçe başlığı kısa, açık ve içeriği tam yansıtır olmalıdır
- Yabancı dilde başlık Türkçe başlık ile birebir uyuşmalıdır
- On-line ilgili formlarda tüm aşamalar doldurulmalıdır
- Araştırma daha önce bir bilimsel toplantıda bildiri (sözlü veya poster) olarak sunulmuş ise, bu bilgi toplantının adı ve tarihiyle birlikte belirtilmelidir.
- Olgu sunumu, derleme, editöre mektup gibi diğer metin çeşitlerinde bölümlü özet hazırlamaya gerek yoktur.
- Özet bölümünde kısaltmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalı ve kaynak, şekil, tablo ve atıf yer almamalıdır.
- Ana metin sayfaları, metin çeşidine göre bölümlendirilmelidir. Özgün araştırmalar amacın belirtildiği giriş, gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma kısımlarından oluşmalıdır. Bulgu ve tartışmanın kısa olduğu metinlerde iki başlık birleştirilerek de aktarılabilir. Olgu sunumu amacın belirtildiği kısa bir girişten sonra detaylı olgu ve tartışmadan oluşmalıdır. Derlemelerde önce kısa bir giriş yapılmalıdır ve ardından derlemenin konusuna uygun oluşturulmuş bölümleri kapsamalıdır.
- Mikroorganizma 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.

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

Örnekler

A. Makaleler

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

- Standart Dergi Makalesi: 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. (Türkçe yazarlı kitaplarda da aynı format kullanılmalı, ancak 5th ed yerine 5. baskı denilmelidir). Bir kuruluş tarafından yayımlanmış olan kitaplarda basımevinin değil, yayımlanan kuruluşun adı ve varsa yayın numarası kullanılmalıdır. Örneğin "İst. Tıp. Fak. Yayın No. 20. İstanbul 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.
- Bildiri Özeti: Seyer A, Yaman M. Çeşitli besiyerlerinde Candida türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. In: Ağaçfidan A, Erturan Z eds. XI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı; 21-25 Ekim 2008; Antalya: Türkiye 2008:509.
- Tez: Küçüker M. Mikoplazmalar [doktora]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 1986.

C. Sanal Ortam

- Web sitesi: World Health Organization. Global strategy for. Geneva: World Health Organization. 2001 [http://www.who.intemational]. (Erişim tarihi: …….).

Şekil, Tablo, Fotoğraf, Resim, Grafik

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

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