Cilt / *Volume* 49
Sayı / *Number* 1
Mart / *March* 2019

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi

Journal of Turkish Society of Microbiology

- ✔ Tüberküloz ve TLR Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki
- ✔ Bir Üniversite Hastanesinde Ensefalit/Menenjit Şüpheli Hastalarda, Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinin Bakteriyel ve Viral Açıdan İncelenmesi
- ✔ Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Kolistin Direnci
- ✔ *Candida parapsilosis*'in Ekstrem Koşullara Toleransında Tuz ve Sıcaklık Stres Direncinin Etkisi
- ✔ Strep A Hızlı Antijen Testiyle Grup Streptokokların Belirlenmesinde İkili Sürüntü Çubuğu Kullanımı Bir Gereklilik mi?

ISSN 0258-2171
e-ISSN 2458-7516

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 49

Sayı / *Number* 1

Mart / *March* 2019

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ DERGİSİ

JOURNAL OF TURKISH SOCIETY OF MICROBIOLOGY

Cilt / *Volume* 49 Sayı / *Number* 1 Mart / *March* 2019

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

Danışmanlar Kurulu / *Advisory Board*

Elif Aktaş, İstanbul
Osman Aktaş, Erzurum
Işın Akyar, İstanbul
Mustafa Altındiş, Sakarya
Mustafa Altay Atalay, Kayseri
Oktay Alver, Bursa
Aykut Aytaç, Ankara
Orhan Baylan, İstanbul
Banu Bayraktar, Ankara
Yunus Emre Beyhan, Van
Gülçin Bayramoğlu, Trabzon
Asuman Birinci, Samsun
Füsun Cömert, Zonguldak
Cengiz Çavuşoğlu, İzmir
Feriha Çilli, İzmir
Ahmet Hilmi Çon, Samsun
Aylin Döğen, Mersin
Ufuk Hasdemir, İstanbul
Gülfem Ece, İzmir
Sevgi Ergin, İstanbul
Duygu Fındık, Konya
Hüseyin Güdücüoğlu, Van
Deniz Gür, Ankara
Selma Gökahmetoğlu, Kayseri
Arzu İlki, İstanbul
Macit İlkit, Adana
Ayşe Kalkancı, Ankara
Aynur Karadenizli, Kocaeli
Zeynep Ceren Karahan, Ankara
Deniz Bahar Akgün Karapınar, İstanbul
Onur Karatuna, İstanbul
Çiğdem Kayacan, İstanbul
Filiz Kibar, Adana
Esra Koçoğlu, Bolu
Hatice Güven Külekçi, İstanbul
Mine Hoşgör Limoncu, İzmir
İpek Mumcuoğlu, Ankara
Barış Otlu, Malatya
Ahmet Özbilgin, Manisa
Nuri Özkütük, Manisa
Betil Özhak, Antalya
Duygu Perçin Renders, Kütahya
Fatma Mutlu Sarıgüzel, Kayseri
Ömer Şimşek, Denizli
Mehtap Ünlü Söğüt, Samsun
Aynur Topkaya, İstanbul
Tülay Yalçınkaya, Ankara
Meltem Yalınay, Ankara
Fadile Yıldız Zeyrek, Urfa

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. Barış Otlu

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.

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

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

Yayın Türü: Yerel Süreli

Basım Yeri / *Printed by*
LOGOS YAYINCILIK TİC. A.Ş.
Yıldız Posta Cad. Sinan Apt. No. 36 D. 66/67
34349 Gayrettepe-İstanbul

LOGOS TIP YAYINCILIĞI
Tel: (0212) 288 05 41
Faks: (0212) 211 61 85
mail: logos@logos.com.tr
web: www.logosyayincilik.com

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* 49 Sayı / *Number* 1 Mart / *March* 2019

İÇİNDEKİLER / *CONTENTS*

DERLEME / *REVIEW*

- **Tüberküloz ve TLR Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki**
  The Relationship Between Tuberculosis and TLR Gene Polymorphisms
  Reika Dilara VAİZOĞLU, Ceren ACAR **1-10**

ÖZGÜN ARAŞTIRMALAR / *CLINICAL INVESTIGATIONS*

- **Bir Üniversite Hastanesinde Ensefalit/Menenjit Şüpheli Hastalarda, Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinin Bakteriyel ve Viral Açıdan İncelenmesi**
  Bacterial and Viral Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples in Patients with Suspected Encephalitis/Meningitis In a University Hospital
  Hüseyin Agah TERZİ, Özlem AYDEMİR, Engin KARAKEÇE **11-16**

- **Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Kolistin Direnci**
  Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates
  Ceren ÖZKUL KOÇAK, Gülşen HAZIROLAN **17-23**

- ***Candida parapsilosis*'in Ekstrem Koşullara Toleransında Tuz ve Sıcaklık Stres Direncinin Etkisi**
  Effect of Salt and Temperature Stress Resistance on the Tolerance of Candida parapsilosis to Extreme Conditions
  Engin KAPLAN, Macit İLKİT, G. Sybren de HOOG **24-29**

- **Strep A Hızlı Antijen Testiyle Grup A Streptokokların Tespitinde İkili Sürüntü Çubuğu Kullanımı Bir Gereklilik mi?§**
  Is It a Necessity to Use Double Swab in the Detection of Group A Streptococci by the Strep A Rapid Antigen Test?
  Mehmet Emin BULUT, Elif AKTAŞ, Gülşah MALKOÇOĞLU, Vildan YAVUZ ÖZER, Berna ÜNAL, Banu BAYRAKTAR **30-34**

- **Kan Kültürlerinden İzole Edilmiş Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarının Seftarolin, Linezolid ve Vankomisin İn Vitro Duyarlılığının Değerlendirilmesi**
  Evaluation of Ceftaroline, Linezolid and Vancomycin in-vitro Susceptibilities of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci Strains Isolated from Blood Cultures
  Fulya BAYINDIR BİLMAN, Barış ÇİÇEK **35-40**

- **Tedavi Başarısızlığı Olan Kronik HBV Hastalarında Nükleoz(t)id Direnç Mutasyonları**
  Nucleos(t)ide Resistance Mutations in Chronic HBV Patients with Treatment Failure
  Nafia Canan GÜRSOY, Barış OTLU, Yusuf YAKUPOĞULLARI, Özkan YENER, Yaşar BAYINDIR, Murat HARPUTLUOĞLU, Mehmet Sait TEKEREKOĞLU **41-46**

- **Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi**
  Fabrication of Chlorogenic Acid Loaded PLGA Nanoparticles and Determination of Antimicrobial Activity
  Yasemin BUDAMA-KILINÇ **47-54**

YAZARLARA BİLGİ ..... **V-VI**

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):1-10
doi:10.5222/TMCD.2019.001

Derleme / *Review*

Tüberküloz ve TLR Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

The Relationship Between Tuberculosis and TLR Gene Polymorphisms

Reika Dilara Vaizoğlu, Ceren Acar

İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Malatya, Türkiye

ÖZ

Dünyadaki başlıca sağlık sorunlarından biri olan tüberküloz, her yıl çok sayıda ölüme neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2018 raporuna göre 2017 yılında 6.7 milyon yeni tüberküloz olgusu bildirilmiştir. Hastalık etkeni, kişileri enfekte ettikten sonra çok uzun süre latent evrede kalabilmektedir. Enfekte olan kişilerden bazıları hasta olurken, bazı kişilerde ise hastalık hiçbir zaman gelişmemekte hatta bunların yaklaşık %90'ı bağışıklık sisteminin verdiği yanıtla kendiliğinden iyileşmektedir. Birçok enfektif hastalıkta olduğu gibi, enfekte olan kişi sayısı ve hasta olan kişi sayısı arasındaki farklılığa konakçı savunması ve organizmanın virülansı arasındaki denge farklılıkları neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu farklılığın nedeni çoğunlukla, konağın bağışıklık sisteminin durumu ile ilişkilendirilmiş ancak yeterli bir yanıt olarak görülmemiştir. Bu durumda, enfektif hastalıklarla konak arasındaki ilişkiyi anlayabilmek için enfektif ajanlara verilen yanıtın genetik temellerinin araştırılması gerekmektedir. Bu derlemede Mycobacterium tuberculosis'e immun yanıtta ya da yatkınlıkta söz konusu olan TLR genlerindeki polimorfizmlerin etkisini inceleyen çalışmalar özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Tüberküloz, TLR, genotipleme*

ABSTRACT

Tuberculosis, one of the major health problems in the world, causes many deaths every year. According to the 2018 World Health Organization (WHO) report, 6.7 million new tuberculosis cases were reported in 2017. The disease can remain in the latent phase for a very long time after infecting the affected individual. While some of the infected people contract the disease, while the others never develop the disease; even about 90% of the contracted people improve and get well by the immune system's response. As in many infectious diseases, the difference between the number of infected people and the number of people with the disease is due differences in balance between the host defense and the virulence of the organism. In the studies conducted; this difference was mostly attributed to the state of the immune system of the host, but this is not accepted as an adequate response. With these terms, the genetic basis of the response to infectious agents needs to be investigated in order to understand the relationship between infectious diseases and the host. In this review we have summarized the studies on the effect of polymorphisms of TLR genes which are involved in the immune response and the susceptibility to Mycobacterium tuberculosis.

Keywords: *Tuberculosis, TLR, genotyping*

Alındığı tarih:
12.06.2018
Kabul tarihi:
23.11.2018
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

R. D. Vaizoğlu 0000-0003-4584-0954
C. Acar 0000-0003-1842-9203

ceren.acar@inonu.edu.tr

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), dünya çapındaki ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) tüberküloz hastalığının etkenidir ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2018 raporuna göre; dünya nüfusunun yaklaşık olarak %23'ü (yaklaşık 1.7 milyar kişi) latent TB enfeksiyonuna sahiptir ve dolayısıyla yaşamları süresince TB hastalığını geliştirme riski taşımaktadırlar. Küresel olarak yaklaşık 10 milyon insan TB hastalığına yakalanmakta ve bu 10 milyonun 5.8 milyonunu erkekler, 3.2 milyonunu kadınlar ve 1 milyonunu çocuklar oluşturmaktadır. Tüberküloz, MTB'nin neden olduğu granülomatöz bir enfeksiyon

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

hastalığıdır. *M. tuberculosis* 90'dan fazla antijen ve çeşitli virülans faktörlerini içerir[1].

Dünya nüfusunun 1/3'i tüberküloz ajanı ile enfekte olmasına rağmen, enfeksiyon genellikle aktif hastalığa dönüşmemektedir. Patojen, hastalığın klinik özelliklerini göstermeyen enfekte kişilerin yaklaşık olarak %90'ında latent hâlde kalmaktadır[2]. Klinik önemine rağmen, MTB patogenezi ve enfekte olanların yaklaşık olarak %10'unun hastalığı geliştirmesini engelleyen konakçı mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Enfeksiyonun başlangıç ve birincil yeri olduğu için akciğerin mikro çevresi, patojen ve konakçı arasındaki dinamik etkileşim hakkında fikir sahibi olmamızı sağlamaktadır[3].

Biyoloji ve tıp alanlarının temel hedeflerinden birisi, enfeksiyon ajanları ile insan ilişkilerini anlamaktır. Bakterilerin etkileşimini ve insan konak fenotipik çeşitliliğini genetik temelli incelemek esastır. İnsan genom projesinin sonuçları, insan konakçı genetiği hakkında ipuçları vermiştir. Fakat yine de bireylerin ve popülasyonların fenotipik değişimlerinden sorumlu olan genomlar arasındaki, doğal olarak ortaya çıkan genetik değişimler hakkında belirli bir bilgiye ulaşılamamıştır. Yeni geliştirilmiş teknolojilerin yardımıyla değişik coğrafi bölgelerde farklı etnik kökene sahip genom dizilerinin tamamını ve farklı popülasyonlar arasındaki varyasyonları karşılaştırmak kolaydır. Böylece doğal olarak insan genomunda meydana gelen çeşitli varyasyonları ve hastalıklarla olan ilişkilerini anlamamız da aynı ölçüde kolaylaşmıştır. Dolayısıyla, popülasyonların geçmişlerini, göç örüntülerini ve iklim değişikliklerini, beslenme kaynaklarını ve patojen baskılarını içeren bu değişen çevresel koşullar Homo sapiens'in adaptasyonunun altında yatan genetik mekanizmaları anlamamıza yol açmıştır. Sonuç olarak, insan genetiğinin hastalığa karşı duyarlılığı, hastalık şiddeti ve tedaviye yanıt üzerindeki etkileri büyük ölçüde çözülecektir[4]. Konakçı için bulaşıcı hastalıktaki çeşitlilik önemli olduğu kadar hastalığın yayılması ve yaygınlaştırılması da önemlidir. Bu çeşitlilik tam olarak anlaşılamamıştır. Özgül tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler-single nucleotide polymorphisms) yardımıyla hasta bireylerde ve sağlıklı bireylerde hastalıkla ilişkili genomik bölgelerin karşılaştırılması olasıdır[4].

Tek Nükleotid Polimorfizmleri

Genomda en yaygın dizi varyasyonlarından biri tek nükleotid polimorfizmleridir. Bunlar birçok hastalığa yatkınlık için değerli belirteçlerdir. SNP'ler, isimlerinden anlaşılacağı üzere, tek bir baz çifti değişimi üreten değişimlerin sonucudur. Her varyasyon belirli bir derecede popülasyonda bulunabilir. Kompleks özelliklerde genetik etkileri ve SNP'lerin hastalıklarla ilişkisini anlamak için Genom Boyu İlişki Çalışmaları (GWAS-Genome-wide association study) kullanılmıştır[5]. Popülasyonlarda SNP varyasyonlarının sıklığı düşük olsa da bazı durumlarda çok önemli rol oynamaktadır. Genetik alanında çalışan birçok araştırmacı, hastalığa özgü olan SNP'leri bulmaya çalışmaktadır. SNP'ler, fenotipik olarak, kodlayıcı olmayan bölgelerin SNP'leri ve kodlayıcı bölgelerin SNP'leri olarak sınıflandırılabilir. Kodlamayan bölgeler, kodlayıcı bölgelere göre daha fazla SNP içerir. SNP'ler genomda heterojen olarak dağılmakta ve genellikle evrim çalışmalarında ve populasyon genetiği çalışmalarında belirteç olarak kullanılmaktadır. Kodlama bölgesindeki SNP'ler genetik koddaki dejenerasyona bağlı olarak, çoğunlukla amino asit diziliminde önemli değişikliklere neden olmazlar. Protein yapısını değiştiren SNP'ler, ilaç metabolizması ve dolayısıyla farmakogenetik çalışmalarda kullanılır. Kodlama bölgesinde bulunan SNP'ler 2 alt tiptir; protein aktivitesini etkileyen fakat protein dizisini etkilemeyen bazı synonymous SNP'ler ve protein amino asit dizisinde değişikliğe neden olan nonsynonymous SNP'lerdir[6-8].

SNP veri tabanları, GWAS üzerinde çalışan araştırmacılar arasında çok popülerdir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan veri tabanı, 6 milyondan fazla insan SNP'i içeren dbSNP'dir. Buna ek olarak, İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı, İnsan OMIM (Çevrimiçi Mendel Mirası), Swiss-Prot ve İnsan Genom Varyasyon Veri Tabanı sıkça kullanılan diğer veri tabanlarıdır[8].

Genomlarda SNP'lerin yaygın olarak bulunması genetik taramalarda baskın bir belirteç olarak kullanılabilirliğini sağlamakta ve bu da etkin taramaların genişlemesine yol açmaktadır. Yeni ilaç keşif projeleri çok sayıda SNP ve birey içerdiğinden dolayı, SNP'ler, tarama ve genotiplendirme için yeni teknolojilerin geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır[7].

Mycobacterium tuberculosis

Tüberküloz patogenezini anlamak için yapılan çalışmalar Teophile Laennec ile 19. yüzyılda başlamıştır ve daha sonra 1865 yılında Jean-Antoine Villemin, MTB enfeksiyonunun bulaşabilirliğini göstermiştir. 1882 yılında Robert Koch, tüberkül basilini etiyolojik ajan olarak tanımlamıştır[9].

Mycobacterium tuberculosis, akciğer tüberkülozu (PTB) hastalarının hapşırma, öksürme ve konuşmaları yoluyla yayılır ve bağışıklığı zayıf insanların enfekte olmasına neden olur. Bu durum, hastalığın yayılmasında tek doğal kaynağın insan olduğunu gösterir[10].

Mikobakteriyel Hücre Duvarı

Bir hücre içi patojeni olan MTB yavaş ürer ve konakçı makrofajların içinde canlı kalabilme yeteneğine sahiptir. Hidrofobik mikolik asitler hücre duvarında bulunur (kuru ağırlığın %50'si) ve aside dirençli bir bakteridir. *Mycobacteria*'nın yavaş üremesi, besin alımını zorlaştıran kalın mikolik asit katmanından kaynaklanmaktadır. Diğer bir yandan kalın olan bu tabaka, lizozomal enzimlere karşı bakteriye direnç kazandırır. Çoğunlukla hücre duvarının dış kısmında mikolik asitleri taşır ve iç kısımda ise esas olarak fosfatidil-miyo-inositol mannozidaz (PIM'ler), arabinogalaktan ve peptidoglikan taşımaktadır. Dış kısmın altında mannoz içeren moleküller bulunur. Bu biyomoleküller mannoglikoproteinler, ilgili lipomannan (LM) ve mannoz kaplı lipoarabinomannan (Man-LAM) olabilir. Bakterilerin dış kapsülü hem arabinomannan hem de hücre yüzeyinde bulunan mannan tarafından oluşmaktadır. Hücrenin yüzeyinde, en bol bulunan mannozlardan biri Man-LAM'dır ve önemli bir virülans faktörüdür. Tüm patojen bakteriler, hızlı üreyen mikobakteriyel suşlarda bulunmayan mannoz kaplı motiflerin özelliklerini daha az patojenik olanlar ile paylaşır[11]. MTB ve insanlar arasındaki konak-patojen etkileşimleri detaylı olarak incelenmiş olsa da tamamen çözülmüş değildir. Doğal bağışıklık yanıtının aktivasyonunda, ilk aşama patojenin kalıp tanıması ile başlar. MTB'nin patojen ile ilişkili moleküler motifleri (Pathogen associated molecular patterns-PAMP), özgül kalıp tanıma reseptörleri (Pattern recognition receptors-PRR) tarafından saptanır. Tanıma yapıldıktan sonra, proinflamatuar sitokinler ve kemokinlerin üretimi; fagositoz, bakteri yok etme ve antijen sunumu gibi olaylar tetiklenir[11].

Toll-benzeri Reseptörler (TLR'ler)

Toll-benzeri reseptörler kalıp tanıma reseptör ailesine aittir. Memelilerde, bu aileden on iki üye bulunur. Dendritik hücreler (DC'ler) ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin hücre zar yüzeyinde veya endositik vezikül zarlarında belirtilirler. 1985 yılında Christiane Nüsslein-Volhard, Drosophila Toll proteinin homologlarının mikrobik enfeksiyona karşı savunmada önemli olduklarını ve evrimsel olarak korunmuş yapılar olduklarını keşfetmiştir[12]. Toll benzeri reseptörler çok çeşitli patojenlere karşı bağışıklık gösterirler. N-terminal ektodomeynleri (ECD) ve lösin zengini tekrar (LRR) ile karakteristik düzlemsel atnalı şekline sahiptirler. Toll benzeri reseptörlerin ligand etkileşimleri belirgin olmasına rağmen, hepsi dış tarafta N terminalleri ve orta kısımda C terminalleri ile karakteristik bir m-şeklinde dimerik kompleks oluşturmaktadır[13]. Ölen hücrelerden veya mikrobiyal patojenlerden gelen endojen moleküller, oldukça korunmuş yapısal motifler olan patojen ile ilişkili moleküler kalıpları gösterir. Tehlike ile ilişkili moleküler kalıplar (Danger Associated Molecular Patters-DAMP'lar) hücre kaynaklıdırlar. Patojenik enfeksiyonun varlığında, travma, iskemi ve doku hasarına yanıt olarak bağışıklığı başlatır ve sürdürürler. Ayrıca TLR'ler tarafından tanınmaktadırlar[14]. PAMP'lar, hücre duvarı bileşenlerini içerir. Bu bileşenler, lipopeptidler, lipopolisakkarid (LPS) ve peptidoglikan (PGN) olarak listelenebilir. Öte yandan viral çift sarmallı RNA, bakteri DNA'sı ve flagellin PAMP olarak sınıflandırılabilir. TLR ailesi tarafından algılanan

PAMP'lar, lipidlerden lipopeptidlere, proteinlere ve nükleik aside kadar değişir. Tehlikeye bağlı moleküler modeller, ısı şoku proteinleri gibi hücreler arası proteinlerin yanı sıra hücre dışı matristen alınan protein parçalarını da içerir[15]. Toll-benzeri Reseptörleri, PAMP veya DAMPlar ile indükleme, AP-1 ve Nükleer faktör kapa-β (NF-κβ) aktivasyonuna, aktarım faktörleri gibi interferon düzenleyici faktörlere (IRF'lere) yol açan sinyal basamaklarını tetikler. Proinflamatuvar sitokin, efektör sitokin ve interferon (IFN) üretimini yönlendiren uyarlanabilir bağışıklık tepkisi, TLR sinyalizasyonunun sonuçlarını oluşturan çeşitli hücresel tepkilerdir. TLR reseptör ailesinin Toll/ Interlökin-1 reseptör (TIR) domeynli adaptörleri olan beş molekül (My-D88, TRIF, Mal, TRAM ve SARM) bu ailenin tüm üyeleri ile etkileşime girer. TLR'ler esas olarak bağışıklıkta önemli bir rol oynayan dalak ve periferik kan lökositlerinde belirtilir. Buna ek olarak, akciğerler ve gastrointestinal sistemde açıklanır[16].

Araştırmacılar, TLR'leri hücresel konumlarına göre iki gruba ayırmışlardır. Farklı noktalardaki TLR'ler farklı belirteçlerin tanımlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. İlk grup TLR ailesinden 1, 2, 4, 5, 6'nın hepsi hücre yüzeyi üzerinde sentezlenir ve lipit yapılarını tanımaktadırlar. TLR5, flagellin proteinin tanınmasında yaşamsal bir role sahiptir. İkinci grup, Toll-benzeri Reseptörler 3, 7, 8, 9 bakterilerin ve virüslerin genomundan türetilen nükleik asitleri tanır ve hücrelerarası bölgelerde bulunmaktadırlar. Bu moleküllere erişim, hücrenin geç endozomları ya da lizozomları içinde bir miktar bozulma gerektirir. Hücredeki bu reseptörlerin lokalizasyonu ve trafiğinin, ligand tespitine izin vermek için önemli bir mekanizma olduğu giderek daha belirginleşmiştir. Önemli olarak, sinyalizasyon sırasında bazı TLR'lerin hareketi, TLR sinyal yollarının aşırı aktifleşmesini önleyebilir[16,17]. TLR ailesinden 2, 4, 6, 9 ve olasılıkla 8, MTB'nin tanınmasıyla ilgilidir. Aynı zamanda, TLR2 ya TLR1 ya da TLR6 ile heterodimer oluşturur ve bu heterodimerler, LAM, LM, 38-kDa ve 19-kDa mikobakteriyel glikoprotein ve fosfatidilinositol manozu (PIM), triaçillenmiş (TLR2/TLR1) veya diaçillenmiş (TLR2/TLR6) lipoproteinler gibi mikobakteriyel hücre duvarı glikolipidlerinin tanınmasında rol oynarlar[18,19].

Aşağıda MTB ile bağlantılı TLR molekülleri hakkında bilgiler verilmektedir.

TLR1

TLR1, özgül patojen ilişkili moleküler paterni ile Gram pozitif bakterileri tanır[20]. TLR1 aynı zaman CD281 olarak adlandırılır. TLR1, TLR2 (bir heterodimer olarak) ile birlikte peptidoglikan ve lipoproteinleri tanır ve makrofaj ve nötrofillerin yüzeyinde bulunurlar[21].

TLR2

TLR2, CD282 olarak adlandırılmaktadır. TLR2, bakteriyel lipoproteinler, lipomannanlar ve lipoteikoik asitler dâhil olmak üzere Gram-pozitif bakterilerin çeşitli PAMP'ların tanınmasında önemli rol oynar[22]. TLR2, sırasıyla triaçile veya diaçile lipopeptitleri tanımak için TLR1 veya TLR6 ko-reseptörlerini kullanır. TLR1 ve 6, TLR2 gibi plazma membranında belirtilir[23]. TLR2, lipoteikoik asit ve di- ve tri-asetillenmiş sistein içeren lipopeptitler gibi lipit içeren PAMP'lara plazma membranından yanıt verir. Bunu, plazma membranında TLR1 veya TLR6 ile dimerik kompleksler oluşturarak yapar[24]. Barbalat ve ark.'nın[25] yapmış olduğu çalışmada, enflamatuar monositlerde, TLR2'nin bakteri ile değil virüs tarafından aktivasyon gösterdiği ve Tip 1 IFN üretimine yol açtığı gösterilmiştir. Ligandların tanınmasında sinyal oluşumunda TLR2'nin diğer TLR'ler ile dimerize olması gerekmektedir[26].

TLR4

TLR4, insanlardaki TLR4 geni tarafından kodlanan ve kromozom 9q-32-33 üzerinde bulunan bir proteindir. Yaklaşık uzunluğu 13 kb'dir. 222 amino asitlik bir proteini kodlayan 3 eksonu vardır[19,27]. TLR4, MTB enfeksiyonuna doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisinin ortaya çıkmasında yaşamsal bir rol oynamaktadır. Bu bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) tanınması ile ilgilidir. Aynı zamanda gram negatif bakterilerden lipopolisakkariti algılar ve doğuştan gelen bağışıklık

sisteminin aktivasyonuna izin verir[28]. TLR4, CD284 olarak da adlandırılır ve MD-2 olarak bilinen başka bir LRR proteini ile kompleks oluştururlar. LPS ve TLR4 arasında direkt etkileşim yoktur, ancak TLR4-MD-2 kompleksinde MD-2, LPS bağlanması için bir köprü gibi davranır. Diğer lipid türlerinin de aktifleştirme yeteneğinde olduğu gösterilmiştir[29].

TLR6

TLR6, insanlarda TLR6 geni tarafından kodlanan bir proteindir ve 2.391 baz çiftinden oluşur. TLR6, monosit, monosit türevi olgunlaşmamış dendritik hücreler (iDC) ve nötrofillerin hücre yüzeyinde belirtilir[30]. N-terminal sinyal peptidi, on dokuz tandem yinelenen hücre dışı LRR motifleri ve sitoplazmik bölgede bir Toll/IL-1R homoloji alanından oluşur. Bulaşıcı ajanlar üzerinde belirtilen PAMP'ları tanır ve etkin bağışıklığın gelişimi için gerekli sitokinlerin üretimine aracılık eder. Fonksiyon, ağırlıklı olarak fare hücrelerinde incelenmiştir. NF-κβ ve Jun N-terminal kinaz (JNK) yolakları, TLR6'nın temel söylemi ile aktive edilir. İnsan hücrelerindeki araştırmalar, TLR6 ve TLR2'nin monosit plazma zarında yer aldığını göstermiştir. Bazı popülasyonlarda, kodlanmış proteinin hücre dışı alanındaki Ser249Pro polimorfizmi artmış astım riski ile ilişkili olabilmektedir[31,32]. Öte yandan, farklı patojenlerin tanınmasındaki, insan TLR6'nın spesifik rolü, TLR1 ve TLR2'ye göre daha az anlaşılmıştır[33]. Son zamanlardaki çalışmalar, TLR6'daki ender SNP'lerin, bazı etnik gruplarda değişen NF-κβ sinyali ve artmış tüberküloz riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir[34].

TLR8

TLR8, filogenetik olarak TLR7'ye çok benzemektedir. TLR8, genel olarak, HIV, VSV (Veziküler Stomatitis Virüs) ve influenza A virüsünden elde edilen R-848, bakteriyel RNA ve ssRNA'yı tanır. TLR8, monositlerde yüksek olmak üzere çeşitli dokularda belirtilir ve bakteri enfeksiyonu sonucu ifade düzeyi artar. Ayrıca sitokin salınımını sağlar[35].

TLR9

TLR9, insanlarda TLR9 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Ayrıca, CD289 olarak da tanımlanmıştır[36]. TLR9, orijinal olarak, bakterilerde sıklıkla bulunan, ancak omurgalılarda ender görülen, metillenmemiş 2'-deoksiribo sitidin fosfat-guanosin (CpG) DNA motiflerini tanımaktadır[37]. Sentetik CpG oligodeoksinükleotitleri (ODN'ler) TLR9 ligandları olarak işlev görür ve DNA'nın TLR9 tanınması, baz dizisinden bağımsız olarak gerçekleşir. pDC'lerin DNA virüs enfeksiyonu veya belirli CpG ODN'lerine karşılık olarak büyük miktarda tip I IFN ürettikleri göz önüne alındığında, pDC'ler tarafından belirtilen TLR9, virüs enfeksiyonu için bir sensör olarak görev yapar[37,38].

MTB-TLR İlişkisi

Doğal bağışıklık sistemi MTB'ye karşı konak savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. İlk aşamada doğuştan bağışıklık sistemi hücreleri MTB'yi tanır. Toll-benzeri Reseptörleri, Nod-benzeri Reseptörleri ve C-tipi lektin reseptörlerini içeren birçok PRR sınıfları MTB'i tanımada rol oynamaktadır. Tüberküloza bağışıklık tepkisinin başında, adaptör molekülleri ile TLR4 ve TLR6 en baskın işlevlere sahip olanlarıdır. MTB'i tanımada, TLR4'ün önemi, fare makrofajları ve transfekte CHO hücreleri ile yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. TLR6, TLR2 ile heterodimer oluşturmaktadır. Mikobakteriler de bulunan hücre duvarı glikolipidleri, bu heterodimerler tarafından tanınmaktadır. Bu bilgiler ışığında birçok bilim insanı TLR ailesinin tüberküloz üzerindeki etkisini araştırmıştır[11]. Çoğu araştırmacı, farklı popülasyonlarda genotiplendirme yaparak, TLR ailesinin söylemine bakmış ve sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte HapMap verileri farklı gruplara uygulanarak meta-analizler de yapılmıştır.

Selvaraj ve ark.[39], Güney Hindistan'daki sağlıklı ve hasta populasyonunda TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TIRAP ve TLR9 polimorfizmlerinin PTB direnci ve yatkınlığına etkisini araştırmışlardır. TLR1 polimorfizminin allel ve genotip frekansları, PTB hastaları ve kontroller arasında anlamlı olarak farklı değildir. Hem kontrol hem de hasta gruplarında minor allel için homozigot genotipi bulunmadığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, TLR4 polimorfizmlerinin allelleri ve genotip frekansları, kontrol ve PTB hastaları arasında anlamlı olmadığını bulmuşlardır. TLR9 polimorfizmleri ile

ilişkili olarak, allellerin ve genotiplerin frekansları sağlıklı kişilerde ve hastalarda benzerdir. T allel sıklığı, hastalar arasında sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksektir.

Hindistan'da Najmi ve ark.[28], TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ile hastalığın şiddetli biçimde PTB'ye duyarlılığını bildirmişlerdir.

Randhawa ve ark.[40], TLR varyasyonlarının, BCG (Bacillus Calmette-Guérin) aşılarına yönelik değişen in vivo immün yanıtlarla ilişkili olduğunu bildirmiştir. BCG ile aşılanan Güney Afrika'daki bebekleri incelemiş ve in-vivo BCG aşılamasından 10 hafta sonra TLR polimorfizmlerinin IL-2 veya IFN-γ yanıtları indüksiyonu ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca TLR6'nın C745T ve G1083C'sinin, sitokin deneyleri tarafından gösterilen lipopeptit uyarısına tepki olarak bir IL-6 azalmasıyla ilişkili olduğunu da bulmuşlardır. Transfekte edilmiş HEK hücreleri diaçillenmiş lipopeptit veya MTB hücre lizatı ile uyarıldıklarında C745T varyant aracılı NF-κβ sinyali düşüktür. Bu araştırmalardan sağlanan tüm veriler incelendiğinde, doğal bağışıklıkta, gen kusurlarının T hücreleri tarafından BCG kaynaklı sitokinlerin üretimini değiştirerek patojene bağlı adaptör yanıtlarını düzenlediği öne sürülmektedir.

TLR genleri TB dahil olmak üzere çeşitli bulaşıcı hastalıklara duyarlılıkta önemli bir rol oynamaktadır. Bu amaçla Baker ve ark.[41], Uganda ve Güney Afrika popülasyonlarında TLR genlerinde genetik varyasyonlar üzerinde çalışmışlardır. Güney Afrika ve Uganda'dan elde edilen örneklerde TLR yolunda 4 gende (TLR2, TLR4, TLR6 ve TIRAP) tam ekson dizileme gerçekleştirmişlerdir. TLR2 ve TLR6'da Uganda popülasyonları ile HapMap popülasyonları arasındaki haplotip sıklığında belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Çalışmanın önemli bulgularından biri de TIRAP ve TLR6'da yeni bir polimorfizm grubudur. Pek çok çalışma, genel olarak, dördüncü ekson içinde kodlanan TLR4 varyantının (Asp299Gly ve Thr399Ile) sinerjik etkisini göstermiştir.

Jahantigh ve ark.[27], İran popülasyonundaki akciğer TB enfeksiyonu ve TLR4 ve TLR9 genlerindeki potansiyel ilişkiyi incelemiş ve anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Buna karşılık, Zhang ve ark.[42], TLR1, TLR2 ve TLR6 polimorfizmlerinin PTB duyarlılığına ilişkin bir meta-analiz yapmışlar ve TLR6 ve TLR2 ile arasında anlamlı ilişki olduğunu göstermişlerdir.

Zhao ve ark.[43], 16 olgu kontrol çalışması üzerinde bir meta-analiz yaparak TLR4 rs4986791 ve TLR9 rs352139 polimorfizmlerinin sırasıyla Afrikalılar ve Asyalılarda artmış PTB riski ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir. Yapılan diğer bir meta analizinde 18907 kişi dâhil edilmiş ve TLR6 ile ilgili bilgiler, rs5743810 için anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Tüm etnik gruplarda bu polimorfizm hastalığa karşı koruma ile ilgilidir. TLR4 rs4986791'in T alelinin Asya alt grubunda TB riskini arttırdığı da bulunmuştur. Ancak, sözü edilen meta-analizde, diğer TLR varyantlarının tüberküloz ile ilişkili olduğu bulunmamıştır[44].

Shey ve ark.[31], TLR6 SNP'lerinin lipopeptidlere ve tüm mikobakterilere karşı değişen immün yanıtlarla ilişkili olup olmadığını belirlemişlerdir. Polimorfizm ve lipopeptid ile indüklenen IL6 üretiminin bağlantısını anlamak amacıyla genin kodlayan bölgesinin dizi analizini yapmışlardır. C745T ve G1083C polimorfizmlerinin, değiştirilmiş IL6 salınımı ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak, TLR6 polimorfizmleri, değişmiş lipopeptid ile indüklenen sitokin yanıtları ve MTB'nin tanınmasında yer alabilir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

MTB'nin enfeksiyona neden olduğu moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır; bu nedenle hastalıkla etkili terapilerle mücadele etmek veya önleme için strateji geliştirmek zordur. Önceki çalışmalar, enfekte olmuş bazı bireylerin enfeksiyöz ajan için güçlü bir bağışıklık yanıtı sergilediğini ve bunun da hastalığın sonucunu belirlediğini göstermiştir[11]. Doğal bağışıklık tepkisinin başlangıç noktasının odağında PAMP'lar bulunur. Bunlar, hücre yüzeylerinde

veya hücre içi bölmelerinde veya doku sıvılarında bulunan PRR tarafından tanınır ve kan dolaşımında dolanırlar. Bu PRR'ler tarafından tanınan PAMP'lar konakçı bağışıklık yanıtını başlatır ve düzenlerler. MTB'nin tanınması, TLR, konakçıdaki NLR ve C-tipi Lektin reseptörü gibi PRR'ler ile sağlanır[45].

TLR polimorfizmleri TB'ye yatkınlık üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. TLR'ler için belirli genotipi olan popülasyon üyelerinin, MTB ligandlarına afinitesi farklılık gösterebilir, bu nedenle sinyal iletiminde değişiklikler meydana gelebilir[46]. TLR'ler, birçok patojene doğal bir bağışıklık tepkisi uyandıran transmembran proteinlerdir. TLR'ler tarafından tanınan mikobakteriyel ligandlar lipoarabinomannan, lipomannan, fosfatidilinositol manozu ve 19 kDa lipoproteindir. Bu ligandların reseptörler tarafından tanınmasından sonra TLR sinyal yolu, TIR alanının MyD88 adaptör proteine bağlanmasıyla aktive edilir. İnflamatuvar sitokinlerin, özellikle de TNF-α seviyelerinin artması, bu durumda bakterilere karşı doğal bağışıklık tepkisini başlatır[46-48].

Buna ek olarak, bağışıklık sisteminde konakçı-patojen birlikteliklerinde TLR'lerden farklı birçok molekül vardır. Pek çok çalışma, MTB'nin tanınmasında TLR4'ün kritik rolü olduğunu göstermiştir[27].

Schurz ve ark.[44], TLR1, 2, 4, 6 ve 9 varyantlarda yaptıkları meta-analiz sonucunda, TLR1 rs4833095'in TB'ye karşı dirençle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu SNP bir serin-asparajin dönüşümüdür. Bu, TLR'lerin katlanmasını ve liganda bağlanma verimliliğini etkiler ve ayrıca TLR2 ile heterodimer oluşumunu yok eder. TLR2, TLR1 ve TLR6 ile heterodimerler oluşturur. Bu yolla çeşitli ligandları tanırlar. Çünkü polimorfizmler, bozuk TLR2 aktivasyonuna neden olursa, birden fazla PRR'yi etkileyebilir ve bağışıklık yanıtı üzerinde bileşik bir negatif etkiye neden olabilir.

Asya popülasyonun da TB'ye yatkınlık TLR4 ilişkilendirilmiştir[49]. Najmi ve ark.[28] 135 PTB hastası ve 250 sağlıklı birey ile Asya Hint popülasyonun da TLR4 polimorfizmleri üzerinde çalışmış ve hastalarda TLR4 Asp299Gly mutasyonunun belirgin olarak yüksek frekansa sahip olduğu görülmüştür.

Wu ve ark.[50], TLR'leri Çin nüfusunda belirteç olarak kullanmışlardır. TLR2, 4, 8 ve 9'un, TB bağışıklığının ve doğal immünitenin aktivasyonunda TLR yolaklarının aktivasyonunda rol oynadığını öne sürmüşlerdir. DeFranco ve ark.[51], Thr399Ile mutasyonunun TLR4 yapısının hücre dışı alanını değiştirebileceğini ve bunun da ligandların TLR4 ile etkileşimini modüle edebileceğini önermektedir. Bu da bozulmuş bağışıklık tepkisine neden olabilir.

Öte yandan, birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda tüberküloz ve TLR SNP'leri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Bunun nedeni olarak TLR'lerin sinyal yolunda birçok molekülün yer aldığı göz önünde bulundurulmalıdır ve ilişki bulmak için birçok aday gen araştırılmalıdır[52].

En çok çalışılan gen, "Doğal Dirence Bağlı Makrofaj Protein 1" geni (NRAMP1) olarak bilinen Chr2q35'teki SLC11A1 genidir[53]. Enfeksiyon hastalıklarında da Chr6p21.3'deki "histokompatibilite lökosit antijeni" (HLA) genleri önemli rol oynamaktadır[49]. IFN-γ reseptör genleri mutasyonları, mikobakteri enfeksiyonu için özgül ve hayatidir. Yapılan diğer çalışmalarda, IL12, IL10 ve TNF-α polimorfizmlerinin tüberküloz hassasiyeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[54]. Bunun yanı sıra D vitamini MTB enfeksiyonlarına karşı doğal immüniteye aracılık eder. Literatürde, birçok çalışma vitamin D reseptörü gen varyasyonları ve tüberkülozun birlikteliğini bildirmektedir[55,56].

PubMed veritabanında TLR polimorfizmleri ve tüberküloz ile ilgili 62 yayınlanmış makale bulunmaktadır. Bu çalışmalardan yalnızca ikisi ülkemizdeki merkezlerde yapılmıştır ve bu araştırıcılar TLR2 ve TLR4 polimorfizmlerine sınırlı sayıda hastada bakmışlardır[52,57,58]. Ülkemizde tüberküloz önemli bir halk sağlığı sorunu olduğundan, artan sayıda hasta ve kontrolle yapılan bu çalışmalar, bölgedeki literatüre katkıda bulunacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu derleme, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2015/69 numaralı yüksek lisans tez projesi kapsamında tamamlanmış olan R. Dilara Vaizoğlu'nun tezinden üretilmiştir. Yazarlar İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

1. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. CDC. Tuberculosis. Centers for Disease Control and Prevention, 2016. http://www.cdc.gov/tb/statistics/default.html (Erişim Tarihi: Temmuz 2017).
3. Schorey JS, Schlesinger LS. Innate immune responses to tuberculosis. Microbiology Spectr. 2016;4(6). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0010-2016
4. Manry J, Quintana-Murci L. A genome-wide perspective of human diversity and implications in infectious disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(1):a012450 https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012450
5. Fareed M, Afzal M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. Egypt J Med Hum Genet. 2013;14(2):123-34. https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.08.001
6. Aitken N, Smith S, Schwarz C, Morin PA. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals : a targeted-gene approach. Mol Ecol. 2004;13(6):1423-31. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02159.x
7. Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. Mol Ecol Resour. 2010;10(6):915-34. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02891.x
8. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. Clin Genet. 2000;58(4):250-64. https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2000.580402.x
9. Daniel TM. The history of tuberculosis. Respir Med. 2006;100(11):1862-70. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006
10. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *Mycobacterium* türlerinin genel özellikleri. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3.Baskı, İstanbul: Nobel Kitapevleri. 2008;2277-83.
11. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Dev Immunol. 2011;2011:405310. https://doi.org/10.1155/2011/405310
12. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997;388(6649):394-7. https://doi.org/10.1038/41131
13. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of toll-like receptors. Structure. 2011;19(4):447-59. https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004
14. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. Immunol Rev. 2012;249(1):158-75. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x
15. Kawai T, Akira S. TLR signaling. Cell Death Differ. 2006;13(5):816-25. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850
16. McGettrick AF, O'Neill LA. The expanding family of MyD88-like adaptors in toll-like receptor signal transduction. Mol Immunol. 2004;41(6-7):577-82. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.006
17. McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 2010;22(1):20-7. https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.12.002
18. Thoma-Uszynski S, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Bo PL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. Science. 2001;291:15-44. https://doi.org/10.1126/science.291.5508.1544
19. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein R, Bazan J F. A family of human receptors structurally related to drosophila toll. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(2):588-93. https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588
20. Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. Crit Care Med. 2002;30(1 Suppl):S1-11. https://doi.org/10.1097/00003246-200201001-00001
21. Farhat K, Riekenberg S, Heine H, et al. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. J Leukoc Biol. 2008;83(3):692-701. https://doi.org/10.1189/jlb.0807586
22. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. Front Immunol. 2012;3:79. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079
23. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature.

1999;401(6755):811-5.
https://doi.org/10.1038/44605
24. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol. 2003;21:335-76.
https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126
25. Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. Nat Immunol. 2009;10(11):1200-7.
https://doi.org/10.1038/ni.1792
26. Akira S. Mammalian toll-like receptors. Curr Opin Immunol. 2003;15(1):5-11.
https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00013-4
27. Jahantigh D, Salimi S, Alavi-Naini R, et al. Association between TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with development of pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeastern Iran. Scientific World Journal. 2013;2013:534053.
https://doi.org/10.1155/2013/534053
28. Najmi N, Kaur G, Sharma SK, Mehra NK. Human Toll-like receptor 4 polymorphisms TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile influence susceptibility and severity of pulmonary tuberculosis in the Asian Indian population. Tissue Antigens. 2010;76(2):102-9.
29. Kim HM, Park BS, Kim JI, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. Cell. 2007;130(5):906-17.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.002
30. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. Gene. 1999;231(1-2):59-65.
https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00098-0
31. Shey MS, Randhawa AK, Bowmaker M, et al. Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide- and mycobacteria-induced IL-6 secretion. Genes Immun. 2010;11:7:561-72.
https://doi.org/10.1038/gene.2010.14
32. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int Immun. 2001;13(7):933-40.
https://doi.org/10.1093/intimm/13.7.933
33. Tantisira K, Klimecki WT, Lazarus R, et al. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. Genes Immun. 2004;5(5):343-6.
https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364096
34. Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. PLoS One. 2007;2(12):e1318.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001318
35. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science. 2004;303(5663):1526-9.
https://doi.org/10.1126/science.1093620
36. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur Cytokine Netw. 2000;11(3):362-71.
37. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-5.
https://doi.org/10.1038/35047123
38. Haas T, Metzger J, Schmitz F, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. Immunity. 2008;28(3):315-23.
https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.013
39. Selvaraj P, Harishankar M, Singh B, Jawahar MS, Banurekha VV. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. Tuberculosis (Edinb). 2010;90(5):306-10.
https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.08.001
40. Randhawa AK, Shey MS, Keyser A, et al. Association of human TLR1 and TLR6 deficiency with altered immune responses to bcg vaccination in south african infants. PLoS Pathog. 2011;7(8):e1002174.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002174
41. Baker AR, Qiu F, Randhawa AK, et al. Genetic variation in TLR genes in Ugandan and South African populations and comparison with HapMap data. PLoS One. 2012;7(10):e47597.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047597
42. Zhang Y, Jiang T, Yang X, et al. Pulmonary tuberculosis susceptibility: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2013;8(5):e63357.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063357
43. Zhao L, Liu K, Kong X, Tao Z, Wang Y, Liu Y. Association of polymorphisms in toll-like receptors 4 and 9 with risk of pulmonary tuberculosis: A meta-analysis. Med Sci Monit. 2015;21:1097-106.
https://doi.org/10.12659/MSM.893755
44. Schurz H, Daya M, Möller M, Hoal EG, Salie M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2015;10(10):e0139711.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139711
45. Thada S, Valluri VL, Gaddam SL. Influence of Toll-Like receptor gene polymorphisms to tuberculosis susceptibility in humans. Scand J Immunol. 2013;78(3):221-9.
https://doi.org/10.1111/sji.12066
46. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 1999;163(7):3920-7.
47. Heldwein KA, Fenton MJ. The role of toll-like receptors

in immunity against mycobacterial infection. Microbes Infect. 2002;4(9):937-44.
https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01611-8

48. Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):296-307.
https://doi.org/10.1038/nrmicro2321
49. North RJ, Jung Y. Immunity to tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2004;22:599-623.
https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104635
50. Wu L, Hu Y, Li D, Jiang W, Xu B. Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. BMC Med Genet. 2015;16:19.
https://doi.org/10.1186/s12881-015-0166-1
51. DeFranco AL, Crowley M, Finn A, Hambleton J, Weinstein SL. The role of tyrosine kinases and map kinases in LPS-induced signaling. Prog Clin Biol Res. 1998;397:119-36.
52. Vaizoglu RD. Investigation of some TLR polymorphisms in tuberculosis patients in Malatya. [Yüksek Lisans tezi] İnönü Üniversitesi, Malatya, 2017.
53. Forget A, Skamene E, Gros P, Miailhe AC, Turcotte R. Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 1981;32(1):42-7.
54. Dorman SE, Picard C, Lammas D, et al. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. Lancet. 2004;364(9451):2113-21.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17552-1
55. Lewis SJ, Baker I, Davey Smith G. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. Int J Tuberc Lung Dis. 2005;9(10):1174-7.
https://doi.org/10.1038/jhg.2010
56. Qu HQ, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Knowledge gaining by human genetic studies on tuberculosis susceptibility. J Hum Genet. 2011;56(3):177-82.
https://doi.org/10.1038/jhg.2010.164
57. Biyikli OO, Baysak A, Ece G, Oz AT, Ozhan MT, Berdeli A. Role of toll-like receptors in tuberculosis infection. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(10):e20224.
https://doi.org/10.5812/jjm.20224
58. Dalgic N, Tekin D, Kayaalti Z, et al. Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene from infection to disease in pediatric tuberculosis. Hum Immunol. 2011;72(5):440-5.
https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.02.001

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):11-16
doi:10.5222/TMCD.2019.011

Araştırma / *Research Article*

Bir Üniversite Hastanesinde Ensefalit/Menenjit Şüpheli Hastalarda, Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinin Bakteriyel ve Viral Açıdan İncelenmesi

Bacterial and Viral Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples in Patients with Suspected Encephalitis/Meningitis In a University Hospital

Hüseyin Agah Terzi, Özlem Aydemir, Engin Karakeçe

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Menenjit ve ensefalit, tanısının hızla konarak erken tedavi yapılması gereken komplikasyonları yüksek enfeksiyon hastalıklarıdır. Bu çalışmada, bölgemizde santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları düşünülen olgulardan gönderilen beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinin bakteriyolojik kültür üremeleri ile Herpes Simplex virüsü (HSV-1/2) sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.*
Yöntem: *SSS enfeksiyonu şüpheli 192 hastanın BOS örneği retrospektif olarak incelendi. BOS örneklerinden üreme olan kolonilerin tür düzeyinde tanımlamaları ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için VITEK 2 otomatize sistemi (BioMeriéux, Fransa) kullanıldı. BOS glukoz, protein ölçüm değerleri de kaydedildi. BOS örneklerinin HSV-1/2 yönünden kalitatif olarak incelenmesinde, Artus® HSV ½ QS-RGQ kiti (Qiagen, Almanya) ve Rotor-Gene Q 5Plex HRM (Corbett Research 6000, Avusturalya) real-time PZR sistemi kullandı.*
Bulgular: *192 BOS örneğinin 11'inde (%6) üreme saptandı. İzole edilen mikroorganizmalar arasında Streptococcus pneumoniae (%45), Staphylococcus epidermidis (%18), Klebsiella pneumoniae (%9), Citrobacter koseri (%9), Pseudomonas aeuroginosa (%9) ve Listeria monocytogenes (%9) saptandı. Laboratuvarımıza viral etken düşünülerek gönderilen 110 örneğin beşinde (%4.5) HSV-1 DNA saptandı. BOS'un biyokimyasal paremetreleri değerlendirildiğinde, üreme saptanan 11 örneğin tümünde glukoz düzeyleri düşük, protein düzeyleri ise yüksek bulundu. HSV-1 pozitif hastaların BOS glukoz düzeyi dördünde yüksek, protein düzeyi ise üç hastada yüksek bulundu.*
Sonuç: *Bölgemizde menenjit ve ensefalite neden olan patojenlerin epidemiyolojisi sürveyans verilerine katkı sağlayacaktır. İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık profillerinin düzenli olarak izlenmesi de etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.*

Anahtar kelimeler: *Akut bakteriyel menenjit, beyin omurilik sıvısı, ensefalit, Herpes simpleks virüs*

ABSTRACT

Objective: *Meningitis and encephalitis are infectious diseases with high risk of complications that must be diagnosed and treated immediately. In this study we aimed to investigate the bacteriological culture results of cerebrospinal fluid (CSF) samples and the frequency of Herpes Simplex Virus (HSV-1/2) in suspected cases of viral infections of central nervous system (CNS).*
Method: *CSF samples of a total of 192 patients with suspected CNS infection were evaluated retrospectively. VITEK 2 (bioMérieux, France) automated system was used for the identification of species, and antibiotic susceptibility tests. Protein and glucose levels in CSF samples were also recorded. Presence of HSV-1/2 DNA was qualitatively evaluated with real-time PCR technique by using Artus® HSV ½ QS-RGQ (Qiagen, Germany) kits on Rotor-Gene system (Qiagen, Germany).*
Results: *Bacteria were isolated in 11 (6%) of 192 CSF samples. Isolated microorganisms were Streptococcus pneumoniae (45%), Staphylococcus epidermidis (18%), Klebsiella pneumoniae (9%), Citrobacter koseri (9%), Pseudomonas aeuroginosa (9%), and Listeria monocytogenes (9%). HSV-1 DNA was detected in five (4.5%) of the 110 samples sent to our laboratory with the thought of viral etiology. The CSF glucose levels were found to be lower and protein levels higher in 11 patients whom we obtained bacterial isolates from culture. Also in the CSF samples of the HSV-1 positive group higher glucose levels in 4, and protein levels in 3 patients were detected*
Conclusion: *Epidemiology of pathogens causing menengitis and encephalitis in our region will contribute to surveillance data. Also monitoring the antibiotic susceptibilities of the isolated bacteria regularly can contribute to improve efficient therapy strategies.*

Keywords: *Acute bacterial meningitis, celebrospinal fluid, encephalitis, Herpes simplex virus*

Alındığı tarih:
09.08.2018
Kabul tarihi:
06.12.2018
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

H. A. Terzi 0000-0003-2343-439X
Ö. Aydemir 0000-0003-4533-6934
E. Karakeçe 0000-0003-1941-621X

agah.terzi@yahoo.com

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Menenjit, beyin ve omuriliği çevreleyen zarların inflamasyonu olarak tanımlanır. Bakteriyel menenjit olguların çoğu çocukluk çağında meydana gelmekte ve akut bakteriyel menenjit yüksek oranda mortalite ve ciddi mobidite riski içeren ölümcül ve acil bir durum olarak nitelendirilmektedir[1]. Bu nedenle erken tanı ve uygun antibiyotik tedavisi ileriki komplikasyonların önlenmesi açısından çok önemlidir.

Bakteriyel menenjite sıklıkla neden olan etkenler arasında *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* ve *Haemophilus influenzae* type b'nin olduğu bildirilmektedir[2,3]. Ancak menenjit patojenlerinin prevalansı ve menenjit etiyolojisi, hastaların yaşı, coğrafi bölgeler, mevsim, popülasyonun belirli etkenlere karşı duyarlılığı, genetik yapı, sosyoekonomik koşullar ve lokal endemik faktörlere bağlı olarak göre değişkenlik gösterebilir[1].

Viral santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları; menenjit, ensefalit, postenfeksiyoz ensefalomiyelit ve yavaş ilerleyen nörolojik hastalıklar gibi pek çok farklı klinik tablo ile karşımıza çıkabilir[4]. Bu klinik tablolar her yaşta görülebilmekte ve aseptik menenjit ve ensefalit olarak iki genel kategoride incelenmektedir. Enfeksiyonun tipine göre akut, subakut ya da kronik olabilen durumlara yol açabilmektedir[4].

Akut menenjit ve ensefalit enfeksiyonlarının etkenleri arasında Herpes Simpleks Virüs (HSV) önemli bir yere sahiptir. Hızlı ilerleyen, ölüme veya kalıcı sekellere neden olabilecek şekilde ciddi seyir gösterebilen bu enfeksiyonların kesinlikle erken tanı ve tedavisi gerekmektedir[5]. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), bu enfeksiyonların tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip hızlı bir yöntem olarak yeğlenmektedir[6]. Beyin omurilik sıvısında (BOS) PZR ile HSV DNA'nın saptanması, HSV ensefaliti tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir[7].

Bölgemizde SSS enfeksiyonlarının bakteriyel ve viral açıdan incelenmesiyle ilgili veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, bölgemizde SSS enfeksiyonları düşünülen olgulardan gönderilen BOS örneklerinin bakteriyolojik kültür üremeleri ile Herpes Simpleks virüsü (HSV-1/2) sıklığı ve incelenen BOS örneklerinin biyokimyasal özelliklerinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2016 ile Aralık 2017 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen ensefalit/menenjit şüpheli 192 hastanın BOS örneği çalışma kapsamında incelendi.

Hastaların BOS glukoz, protein değerlerine bakıldı ve hücre sayımı yapıldı. Laboratuvara gelen örnekler santrifüj edildikten sonra Gram boyama yapıldı ve koyun kanlı agar, eozin metilen blue agar ve çikolatamsı agara ekimleri yapıldı. Besiyerleri 24-48 saatlik inkübasyona bırakıldı. On sekiz-yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda üreme olan kolonilerin tür düzeyinde tanımlamaları ve antibiyotik duyarlılıklarının tespiti için VITEK 2 otomatize sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanıldı. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları güncel CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre değerlendirildi[8]. BOS glukoz normal değeri 40-70 mg/dL, BOS protein normal düzeyi ise 15-45 mg/dL olarak kabul edilmiştir.

HSV-1/2 istemiyle gönderilen 110 BOS örneklerinin de eşzamanlı olarak bakteriyolojik kültürleri yapıldı. BOS örneklerinin HSV-1/2 yönünden kalitatif olarak incelenmesinde, Artus® HSV½ QS-RGQ kiti (Qiagen, Almanya) ve Rotor-Gene Q 5Plex HRM (Corbett Research 6000, Avusturalya) real-time PZR sistemi kullandı. BOS örneklerinden nükleik asit izolasyonu spin kolon yöntemi ile QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

BOS örnekleri çalışılan hastaların 86'sı (%45) kadın, 106'sı (%55) erkek olup, ortanca yaş değeri 38 (yaş aralığı: 0-95 yıl) olarak bulunmuştur. Hastaların 61'i (%32) çocuk (yaş aralığı:0-18 yıl), 131'i (%68) erişkin (yaş aralığı: 19-95 yıl) yaş grubundadır. İşleme alınan

192 BOS örneğinin 11'inde (%6) üreme saptandı. Üreyen etkenlerin kliniklere göre dağılımına bakıldığında, en sık acil ve çocuk hastalıkları servisinden olmak üzere intaniye ve beyin cerrahi kliniklerinden gönderilen örneklerde üreme belirlendi. Üreme saptanan örneklerin beşi hidrosefali nedeni ile şant takılan hastalarda saptanırken, diğer hastalarda ise travma veya geçirilen bir operasyon öyküsü bulunmaktaydı. İzole edilen mikroorganizmalar arasında *Streptococcus pneumoniae* (%45), *Staphylococcus epidermidis* (%18), *Klebsiella pneumoniae* (%9), *Citrobacter koseri* (%9), *Pseudomonas aeuroginosa* (%9) ve *Listeria monocytogenes* (%9) belirlendi. Tüm numunelerden yapılan hücre sayımlarında 1.000/mm^3 üzerinde hücre görüldü. Üreme saptanan tüm hastaların BOS proteinleri artmış, glukoz düzeyleri azalmıştı (Tablo 1).

Streptococcus pneumoniae suşlarında en yüksek direnç trimetoprim sülfametaksazole (%75) karşı saptanırken, penisilin, seftazidim, seftriakson, levofloksasin, vankomisin direncine rastlanmadı. *S. epidermidis* suşlarının hepsinde penisilin ve oksasilin (%100) direnci saptandı (Tablo 2).

Laboratuvarımıza PCR istemiyle gönderilen 110 örnekte HSV-1/2 çalışıldı. Yüz on örneğin beşinde (%4.5) HSV-1 pozitif saptanırken, HSV-2 hiçbir örnekte belirlenmedi (Tablo 1). HSV-1 DNA tespit edilen örneklerde kültür üremesi saptanmamıştır. HSV-1 pozitif olan dört hastanın BOS glukoz düzeyi yüksek bulundu. Protein düzeyi ise iki hastada normal, üç hastada yüksek bulundu.

Çalışmamızda, BOS'un biyokimyasal paremetreleri tüm örnekler arasında değerlendirildiğinde; 86'sında (%44) BOS glukoz düzeyleri yüksek düzeylerde, 125'sinde (%65) ise BOS protein değerleri yüksek düzeylerde saptandı. Viral ve bakteriyel etkenlerin izole edildiği BOS örneklerinin protein ve glukoz düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. BOS örneklerinin bakteriyel ve viral açıdan laboratuvar incelemesi.

Sayı	Etken	BOS Glukoz (mg/dL)	Eşzamanlı kan glukoz (mg/dL)	BOS protein (mg/dL)	Lökosit-PNL	Hücre sayımı
5	*Streptococcus pneumoniae*	1-13	96-159	222-578	çok sayıda	1000 ≤
2	*Staphylococcus epidermidis*	5-11	42-298	276-320	çok sayıda	1000 ≤
1	*Klebsiella pneumoniae*	0	149	350	çok sayıda	1000 ≤
1	*Citrobacter koseri*	25	109	258	çok sayıda	1000 ≤
1	*Listeria monocytogenes*	1	122	374	çok sayıda	1000 ≤
1	*Pseudomonas aeuroginosa*	22	113	298	çok sayıda	1000 ≤
5	Herpes Simpleks Virüs	71-203	91-354	29-56	-	-

Tablo 2. İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları ve kliniklere göre dağılımı.

		AMC	TZP	GM	AN	T	CXM	CRO	P	OXA	SXT	VAN	TEC	İMP	MEM	CIP	LEV	E	Servis
1	*S. pneumoniae*	-	-	-	-	R	S	S	S	-	S	S	S	-	-	S	S	R	Acil
2	*S. pneumoniae*	-	-	-	-	S	S	S	S	-	R	S	S	-	-	S	S	S	Çocuk hastalıkları
3	*S. pneumoniae*	-	-	-	-	R	S	S	S	-	S	S	S	-	-	S	S	S	Çocuk hastalıkları
4	*S. pneumoniae*	-	-	-	-	S	S	S	S	-	R	S	S	-	-	S	S	S	Acil
5	*S. pneumoniae*	-	-	-	-	S	S	S	S	-	R	S	S	-	-	S	S	S	Acil
6	*S. epidermidis*	-	-	R	-	R	-	-	R	R	S	S	S	-	-	-	-	-	Çocuk hastalıkları
7	*S. epidermidis*	-	-	R	-	R	-	-	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-	Beyin cerrahi
8	*K .pneumoniae*	S	S	S	S	-	R	R	-	-	S	-	-	S	S	S	-	-	Acil
9	*C. koseri*	S	S	S	S	-	R	R	-	-	S	-	-	S	S	S	S	-	Çocuk hastalıkları
10	*L. monocytogenes*	-	-	S	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	S	S	İntaniye
11	*P. aeruginosa*	-	S	S	S	R	S	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	-	Çocuk hastalıkları

S: Duyarlı, R:Dirençli, AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, GM: Gentamisin, AN: Amikasin, T: Tetrasiklin, CXM: Sefuroksim/Aksetil, CRO: Seftriakson, P: Penisilin, OXA: Oksasilin, SXT: Trimetoprim/Sulfametaksazol, VAN: Vankomisin, TEC: Teikoplanin, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, E: Eritromisin

TARTIŞMA

Akut bakteriyel menenjit çocuklarda ve yenidoğan bebeklerde dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olduğundan erken tanı konarak acil tedavi edilmesi gerekmektedir[2,3,9]. Bazı gelişmekte olan ülkelerde, akut bakteriyel menenjitin mortalite oranı yeni ve etkili antibiyotikler bulunmasına rağmen hâlâ çok yüksektir (%16-32)[9-11].

Menenjite neden olan bakterilerin sıklığı, bölgeler arasında farklılıklar gösterebilmektedir. Batı ülkelerinde, yetişkinlerde *S. pneumoniae*, yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda ise *S. pneumoniae, H. influenzae* ve *N. meningitidis* en sık menenjite neden olan etkenler olarak bildirilmiştir[12]. Van de Beek ve ark.'nın[13] toplum kökenli akut bakteriyel menenjit hastalarını inceledikleri bir çalışmada ise, *S. pneumoniae* (%51) ve *N. meningitidis* (%37) en sık rastlanan patojenler olarak belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise, bakteriyel menenjitli çocuklardan izole edilen dominant bakteri olarak *N. meningitides* serogroup W135 rapor edilmiştir[14]. Yine ülkemizde akut bakteriyel menenjitli hastaların dokuz yıllık etken dağılımının incelendiği bir başka çalışmada; *S. pneumoniae, H. influenzae* ve *N. meningitidis* sıklıkları sırasıyla %27, %11 ve %11 oranlarında bildirilmiştir[15]. Çalışmamızda ise en sık *S. pneumoniae* (beş hastada) saptanırken, sonrasında *S. epidermidis* (iki hastada) saptanmıştır. Bunların yanında birer hastada *K. pneumoniae, C. koseri, P. aeuroginosa* ve *L. monocytogenes* saptanmıştır. Bu çalışmalara bakıldığında, menenjitten sorumlu patojenlerin sıklıklarının nispeten değişebildiği görülmektedir.

Çocuklardaki akut bakteriyel menenjitin epidemiyolojisinde son zamanlarda bazı değişiklikler gözlenmektedir[16]. Bu değişikliklerden biri bazı gelişmiş ülkelerde aşı uygulamasına bağlı olarak *S. pneumoniae, H. influenzae* type b ve *N. meningitides* prevalansındaki anlamlı azalmadır[17,18]. Çalışmamızda da, benzer olarak akut bakteriyel menenjitin sık etkenleri arasından *H. influenzae* tip b ve *N. meningitidis*'e rastlanılmadı. *S. pneumoniae* ise gönderilen örneklerin beşinde (%3) üredi. Bu bulgular menenjit aşısı uygulanan diğer gelişmiş ülkelerdeki verilerle uyumlu olarak ülkemizde de aynı şekilde prevalanstaki bir azalmayı doğrular niteliktedir.

Akut bakteriyel menenjit epidemiyolojisindeki bir diğer değişiklik ise dünya genelinde pnömokok suşlarındaki direnç artışıdır. Bilinçsiz ve uygun olmayan antibiyotik kullanımı da dirençli bakterilerin seçilmesini arttırarak tedaviye dirençli menenjit olgularının gelişimine katkıda bulunmaktadır[19,20].

Viral SSS enfeksiyon etkeni olan HSV, ensefalit ve menenjit gibi hastalıklara neden olabilmektedir[21]. Aseptik menenjitlerde çocuklarda en sık etken enteroviruslar olmakla birlikte, HSV diğer önemli virus grubunu oluşturmaktadır[22]. HSV-2'nin sorumlu tutulduğu menenjit tabloları, daha çok genital herpes enfeksiyonları sonrası reaktivasyonla oluşan sınırlı bulgulara sahip ve kendiliğinden düzelebilen özellikte olmaktadır[23].

Viral ensefalitler için bugüne kadar elde edilen bulgulara göre en sık karşılaşılan etiyolojik ajanın HSV-1 olduğu gösterilmiştir. Yıllık insidansı 1-4/1 milyon olan HSV-1; ensefalit olgularının %0.8-30'unda, nekrotizan ensefalitlerin %20-75'inde etken olarak rapor edilmiştir[24]. Son yıllardaki bazı araştırma sonuçları ise HSV-1 ile beraber, VZV, enteroviruslar ve influenza A virus gibi ajanların başlıca viral etkenler olduğunu göstermektedir[25]. HSV-2'ye bağlı gelişen ensefalit ise özellikle infantlar olmak üzere her yaş grubunda nadiren ciddi ensefalit tablolarına neden olabilmektedir[23].

Akut HSV ensefaliti, önceleri morbiditesi çok yüksek bir hastalık iken asiklovir'in kullanımıyla tedavi edilebilir bir hastalık hâline gelmiş ve HSV ensefaliti ile ilişkili morbidite oranı son yıllarda %5-15'e kadar düşmüştür[26]. Fakat antiviral ilaç kullanımı, HSV'ye bağlı mortaliteyi erken tanı ve tedavide daha etkin olarak azaltmaktadır. Kötü prognozlu HSV ensefalitine ise hastalığın teşhisinde ve tedavisinde gecikme olduğu zaman rastlanılmaktadır[27]. Bu nedenle SSS

enfeksiyonunun en kısa sürede tanımlanması, etkenin belirlenip tedavinin başlanılması büyük önem göstermektedir. PZR, bu enfeksiyonların laboratuvar tanısında kullanılan altın standart yöntemdir[5]. HSV'nin ensefalit/menenjit şüpheli olgulardaki etiyolojik rollerini araştırdığımız bu çalışmada, HSV DNA'sının gösterilmesini sağlayan real-time PZR yöntemi kullanılmıştır.

HSV'ye bağlı SSS enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, Bhaskaran ve ark.[28] 1663 BOS örneğinde %0.9 oranında HSV DNA pozitif bulmuşlardır. Bir başka çalışmada, viral SSS enfeksiyonu düşünülen 662 hastanın BOS örneğinde %2.87 oranında HSV-1 DNA, %1.5 oranında HSV-2 DNA pozitif saptamıştır[29]. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise, elde edilen verilere göre HSV DNA pozitiflik oranının %1-19 arasında saptandığı gözlenmektedir[30-32]. Çalışmamızda ise, literatürle uyumlu olarak PCR istemi olan 110 BOS örneğinin beşinde (%4.5) HSV-1 DNA pozitif olarak saptanmıştır. Ancak, HSV-1 DNA'nın enfeksiyonun ilerleyen günlerinde saptanmasındaki zorluk veya hastalara asiklovir tedavisi başlandıktan sonra örnek gönderilmesi gibi nedenler, çalışmamızdaki HSV-1 DNA saptanma oranlarını düşürmüş olabilir.

Çalışmamızda, BOS'un biyokimyasal paremetreleri tüm örnekler arasında değerlendirildiğinde, 86'sında (%44) BOS glukoz düzeyleri, 125'inde (%65) ise BOS protein değerleri yüksek düzeylerde saptandı. Bakteriyel menenjitlerde BOS glukoz konsantrasyonu <40 mg/dL şeklindedir ve BOS/serum glukoz konsantrasyonu oranı hastaların %70 kadarında 0.3'ün altındadır. BOS proteini ise bütün hastalarda artmaktadır. Çalışmamızda, klavuzlarla uyumlu olarak, üreme saptanan örneklere ait BOS glukoz düzeyleri düşük, protein düzeyleri ise yüksek saptandı. BOS'un incelenmesinde glukoz normal, protein normal/artmış saptanması olası viral ensefalit düşündürmektedir. Yine çalışmamızda, HSV-1 pozitif olan hastalardaki BOS glukoz ve protein düzeyleri klavuzlardan farklı olarak çoğunlukla yüksek düzeyde saptandı.

SSS enfeksiyonlarında mortalite ve morbidite oranı yüksek olduğundan etkenin çok hızlı tanımlanması yaşamsal öneme sahiptir. Herpes virüslerinin neden olduğu ensefalit olguları ile daha sık karşılaşılsa da diğer viral ve bakteriyel etkenler de akılda tutulmalıdır. Bölgemizde menenjite neden olan patojenlerin epidemiyolojisi sürveyans verilerine katkı sağlayacaktır. İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık profillerinin düzenli olarak izlenmesi de etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Aynı zamanda elde edilen verilerle, etken bakterilere karşı aşılamada hedeflerin belirlenmesinde kolaylık sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Gonzalez-Granado LI. Acute bacterial meningitis. Lancet Infect Dis. 2010;10(9):596. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70184-5
2. Kuti BP, Bello EO, Jegede TO, Olubosede O. Epidemiological, clinical and prognostic profile of childhood acute bacterial meningitis in a resource poor setting. J Neurosci Rural Pract. 2015;6(4):549-57. https://doi.org/10.4103/0976-3147.165424
3. Briand C, Levy C, Baumie F, et al. Outcomes of bacterial meningitis in children. Med Mal Infect. 2016;46(4):177-87. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2016.02.009
4. Us AD. Viral santral sinir sistemi enfeksiyonları. In: Us AD, Ergünay K (ed). Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2012:271-94.
5. Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, et al. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. Clin Infect Dis. 2003;36(6):731-42. https://doi.org/10.1086/367841
6. Delbue S, Tremolada S, Ferrante P. Application of molecular tools for the diagnosis of central nervous system infections. Neurol Sci. 2008;29(Suppl 2):S283-5. https://doi.org/10.1007/s10072-008-0965-7
7. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. Herpes. 2004;11(Suppl 2):48A-56A.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. 28th ed. Wayne, PA USA, 2018.
9. Jarousha AM, Afifi AA. Epidemiology and risk factors associated with developing bacterial meningitis among children in Gaza Strip. Iran J Public Health. 2014;43(9):1176-83.
10. Namani S, Milenkovic Z, Kuchar E, Koci R, Mehmeti M.

Mortality from bacterial meningitis in children in Kosovo. J Child Neurol. 2012;27(1):46-50. https://doi.org/10.1177/0883073811413280
11. Nickerson JW, Attaran A, Westerberg BD, Curtis S, Overton S, Mayer P. Fatal bacterial meningitis possibly associated with substandard ceftriaxone-Uganda, 2013. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016;64(50-51):1375-7. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6450a2
12. Saez-Llorens X, McCracken GH. Acute bacterial meningitis beyond the neonatal period. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG (eds). Principles and practice of pediatric infectious diseases. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2008:284-91. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3468-8.50048-1
13. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. N Engl J Med. 2004;351(18):1849-59. https://doi.org/10.1056/NEJMoa040845
14. Kilic A, Urwin R, Li H, Saracli MA, Stratton CW, Tang YW. Clonal spread of serogroup W135 meningococcal disease in Turkey. J Clin Microbiol. 2006;44(1):222-4. https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.222-224.2006
15. Özdemir H, Tapsız A, Çiftçi E, İnce E, Doğru Ü. Çocuklarda akut bakteriyel menenjit. Çocuk Enf Derg. 2010;4(1):9-14.
16. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):467-92. https://doi.org/10.1128/CMR.00070-09
17. Ba O, Fleming JA, Dieye Y, et al. Hospital surveillance of childhood bacterial meningitis in Senegal and the introduction of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(6):1330-5. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0346
18. Nwadioha SI, Nwokedi EO, Onwuezube I, Egesie JO, Kashibu E. Bacterial isolates from cerebrospinal fluid of children with suspected acute meningitis in a Nigerian tertiary hospital. Niger Postgrad Med J. 2013;20(1):9-13.
19. Iregbu KC, Abdullahi N. Profiles of acute bacterial meningitis isolates in children in National Hospital, Abuja. Niger Med J. 2015;56(4):297-300. https://doi.org/10.4103/0300-1652.169749
20. Toprak D, Soysal A, Torunoglu MA, et al. PCR-based national bacterial meningitis surveillance in Turkey: years 2006 to 2009. Pediatr Infect Dis J. 2014;33(10):1087-9. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000378
21. Nadelman CM, Newcomer VD. Herpes simplex virus infections. Postgrad Med. 2000;107(3):189-200. https://doi.org/10.3810/pgm.2000.03.948
22. Bamberger DM. Diagnosis, initial management, and prevention of meningitis. Am Fam Physician. 2010;82(12):1491-8.
23. 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(11):1527-33. https://doi.org/10.1086/379520
24. Logan SA, MacMahon E. Viral meningitis. BMJ. 2008;336(7634):36-40. https://doi.org/10.1136/bmj.39409.673657.AE
25. Kennedy PG. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis, and management. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004;75(Suppl 1):10-5. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.017 https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.034280
26. Sili U, Kaya A, Mert A. Encephalitis Study Group. Herpes simplex virus encephalitis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 106 adult patients. J Clin Virol. 2014;60(2):112-8. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.03.010
27. Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes simplex virus-1 encephalitis in adults: pathophysiology, diagnosis, and management. Neurotherapeutics. 2016;13(3):493-508. https://doi.org/10.1007/s13311-016-0433-7
28. Bhaskaran A, Racsa L, Gander R, Southern P, Cavuoti D, Alatoom A. Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77(3):236-40. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.017
29. Studahl M, Hagberg L, Rekabdar E, Bergström T. Herpesvirus DNA detection in cerebral spinal fluid: differences in clinical presentation between alpha-, beta-, and gamma-herpesviruses. Scand J Infect Dis. 2000;32(3):237-48. https://doi.org/10.1080/00365540050165857
30. Kaşifoğlu N, Aslan M, Durmaz G, Us T. Santral sinir sistemi enfeksiyonlarında, herpes simplex virüs varlığının beyin omurilik sıvısı örneklerinde real–time PZR yöntemiyle araştırılması. Osmangazi Tıp Dergisi. 2017;39(3):62-7. https://doi.org/10.20515/otd.307373
31. Zeytinoğlu A, Altuğlu İ, Sayıner A, et al. Herpes ensefalitinin beyin omurilik sıvısı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. Flora. 2000;5(3):179-82.
32. Altuglu I, Zeytinoglu A, Sirin H, Yuceyar N, Erensoy S. Comparison of different polymerase chain reaction methods for detection of herpes simplex virus types 1 and 2 encephalitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006;25(10):669-71. https://doi.org/10.1007/s10096-006-0202-3

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):17-23
doi:10.5222/TMCD.2019.017

Araştırma / *Research Article*

Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Kolistin Direnci

Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates

Ceren Özkul Koçak*, Gülşen Hazırolan**

*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Karbapeneme dirençli Klebsiella pneumoniae ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde yaşanan kısıtlılıklar, son yıllarda yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Bu enfeksiyonlara karşı son seçenek ilaç olarak görülen kolistinin yaygın kullanımı sonucu kolistin direncinde artış görülmektedir.*
Yöntem: *Bu çalışmada, Eylül 2018-Aralık 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve karbapenem direnci belirlenmiş 81 K. pneumoniae izolatında kolistine duyarlılık sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle EUCAST standartlarına göre belirlenmiştir.*
Bulgular: *Test edilen izolatların %39.5'inde (n=32) kolistin direnci saptanmıştır. İdrar izolatlarının %35'i, kan izolatlarının %56'sı kolistin dirençli bulunmuştur. Çalışmaya dâhil edilen 3 beyin omurilik sıvısı örneği de kolistin dirençli olarak belirlenmiştir.*
Sonuç: *Yüksek kolistin direnç oranları çoklu ilaç dirençli K. pneumoniae enfeksiyonlarının tedavilerinde sorun yaşanmasına neden olacaktır.*

Anahtar kelimeler: *Karbapenem dirençli Klebsiella pneumoniae, kolistin, antimikrobiyal duyarlılık*

ABSTRACT

Objective: *The limitations of treatment options in carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae infections have been related to high morbidity and mortality in recent years. The wide usage of colistin as the last-line treatment for those infections has led to the development of an increasing resistance to colistin.*
Method: *In the present study, a total of 81 carbapenem- resistant K. pneumoniae, which were isolated from various clinical specimens in Central Laboratory of Hacettepe Universiy Medical Faculty between September 2018-December 2018, were tested against colistin by using broth microdilution method according to the EUCAST standards.*
Results: *Colistin resistance was determined in 39.5% (n=32) of the isolates tested. According to the sample site, 35% of the urine isolates and 56% of the blood isolates were resistant to colistin. Isolates all of the total 3 cerebrospinal fluid samples included in the analysis were also resistant to colistin.*
Conclusion: *The high prevalence of colistin resistance may cause limitations in treatment options in multiple- drug resistant K. pneumoniae infections.*

Keywords: *Carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae, colistin, antimicrobial susceptibility*

Alındığı tarih:
20.12.2018
Kabul tarihi:
22.01.2019
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

C. Özkul Koçak 0000-0002-0921-5863
G. Hazırolan 0000-0003-4546-9729

✉ cerenozkul@hacettepe.edu.tr

GİRİŞ

Çok ilaca dirençli Gram-negatif bakteriler dünyada birçok ülkeden artan oranda rapor edilmektedir[1]. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* yüksek mortalite oranlarının görüldüğü salgınlara neden olabilen, özellikle yoğun bakım hastalarından sıklıkla izole edilen nozokomiyal patojenlerdendir[2]. Çok

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

ilaca dirençli, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (ESBL) ve karbapenemaz enzimlerini bulunduran izolatlar özellikle gelişmekte olan ülkelerde, antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımı ile birlikte yüksek prevelans göstermektedir[3,4].

Geniş etki spektrumu olan karbapenemler, ESBL üreten enterik bakterilerde ilk seçenek tedavilerdendir[5]. Karbapenem dirençli bakteriyel enfeksiyonlarda en sık izole edilen etken *K. pneumoniae*'dır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2014 yılında yayınlanan global direnç raporuna göre *K. pneumoniae* karbapenem dirençli izolatlar %50 üzerinde bildirilmiş ve bu oranın oldukça kritik seviyelerde olduğu vurgulanmıştır[6]. DSÖ CAESAR 2018 yılı raporuna göre ise Türkiye'de kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında ertapenem direnci %43, İmipenem/meropenem direnci %38 olarak bildirilmiştir[7].

Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek tedavi alternatifi olan kolistin (Polimiksin E) kullanılmaktadır. Kolistin, polimiksin grubu eski bir antibiyotik olup, daha önceki yıllarda nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi yan etkilerinden dolayı kullanımı yeğlenmemiştir[8,9]. Ancak günümüzde kolistin, karbapenem dirençli Gram-negatif etkenlerin tedavisi için tigesiklin ile birlikte tek tedavi alternatifi olarak artan oranda kullanılmaktadır. Kolistin, özellikle karbapenem dirençli *K. pneumoniae* kan dolaşımı enfeksiyonlarında, konsantrasyona bağlı bakterisidal etkisi ve serumda yeterli konsantrasyona ulaşabilme özellikleri ile tek seçenek tedavidir[10].

Kolistinin karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da tek seçenek tedavi olması ile birlikte kullanımı yaygınlaşmış ve kolistin direnci artmaya başlamıştır. Kolistin direnci kromozomal mutasyonlar sonucu veya plazmid aracılı olabilmektedir[11,12]. Karbapenem dirençli enterik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda tek seçenek tedavi olan kolistine karşı direnç günümüzde önemli klinik sorunların başında gelmektedir.

Bu çalışmada, Eylül 2018-Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direnç prevelansının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Eylül 2018-Aralık 2018 tarihleri arasında izole edilen çeşitli klinik örneklerden izole 81 *K. pneumoniae* izolatı dâhil edilmiştir. Kan kültürü örnekleri BD BACTEC Fx (Becton Dickinson, Maryland, ABD) otomatize sisteminde inkübe edilmiştir. Üreme sinyali veren örnekler Gram boyama işlemine tabi tutulmuş ve %5 koyun kanlı agar, çukulata agar, Mac Conkey agar besiyerlerine ekilerek 24-48 saat süresince inkübe edilmiştir. İdrar örnekleri %5 koyun kanlı agar ve Mac Conkey agar besiyerlerine, solunum sistemi örnekleri %5 koyun kanlı agar, çukulata agar, Mac Conkey agar besiyerlerine, periton sıvısı, doku ve safra örnekleri ise %5 koyun kanlı agar, çukulata agar, Mac Conkey agar ve Tiyoglukonatlı sıvı besiyerlerine ekilerek 24-48 saat süresince inkübe edilmiştir. Besiyerlerinde üreme gözlenen mikroorganizmaların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve MALDI TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) kullanılmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri PhoenixTM 100 otomatize sistemi (Beckton Dickinson, ABD) ile saptanmıştır. Otomatize sistem ile karbapenemlerden en az birine karşı direnç saptandığında gradiyent test ile konfirmasyonu yapılmış ve gradiyent test sonuçları baz alınmıştır. Dolayısıyla, Phoenix™ 100 otomatize sisteminden elde edilen imipenem, meropenem ve ertapenem duyarlılık sonuçları gradient test (Biomerieux, Fransa) ile konfirme edilmiş, gradient testle de imipenem, meropenem ve ertapenem direnci saptanan izolatlar, karbapenem dirençli olarak kabul edilmiştir.

Hastane merkez laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 81 adet *K. pneumoniae* izolatının kolistine duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle EUCAST standartlarına göre saptanmıştır. Duyarlılık kategorileri EUCAST v8.1'de belirtilen klinik duyarlılık sınır değerlerine göre belirlenmiştir. Kolistin için MİK ≤2 mg/L bulunan izolatlar duyarlı olarak

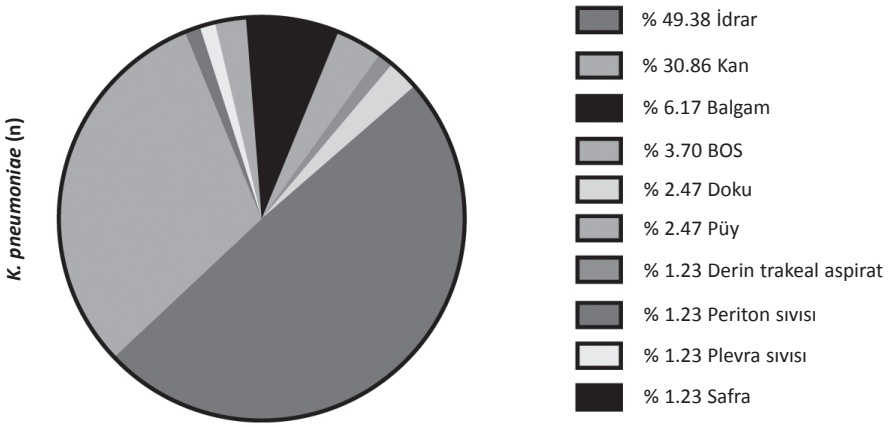
kabul edilmiştir[13]. Özetle, Mueller Hinton Broth eklenen 96 kuyucuklu mikroplaklarda kolistinin 0.0625-64 µg/mL aralığındaki iki kat azalan konsantrasyonları hazırlanmıştır. Kolistin sülfatın kullanım konsantrasyonu (Sigma, ABD) 128 µg/mL olarak hazırlanmıştır. Kolistine duyarlı ve kolistin dirençli kontroller için sırasıyla *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *mcr1* pozitif *E. coli* NCTC 13846 standart bakterileri kullanılmıştır.

BULGULAR

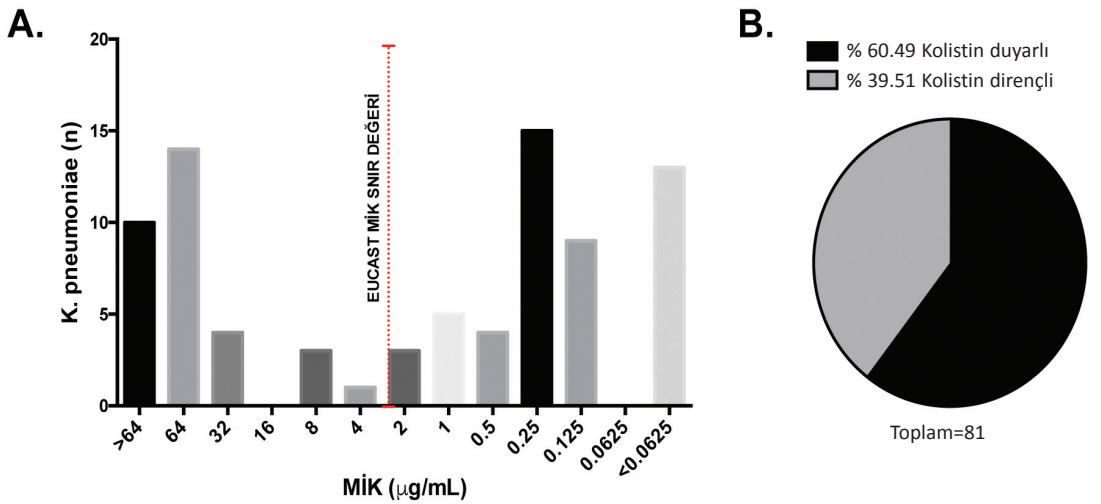
Çalışmaya dâhil edilen 81 *K. pneumoniae* izolatının izole edildikleri klinik örneklerin sıklığı sırasıyla 40 (%49.4) idrar, 25 (%30.9) kan, 5 (%6.2) balgam, 3 (%3.7) beyin omurilik sıvısı, 2 (%2.5) doku, 2 (%2.5) püy, 1 (%1.2) periton sıvısı, 1 (%1.2) plevra sıvısı, 1 (%1.2) safra, 1 (%1.2) derin trakeal aspirat) olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1).

Karbapeneme dirençli olarak belirlenen 81 izolatın kolistin direnci EUCAST tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiş ve izolatların %39.51'i dirençli olarak saptanmıştır (Şekil 2).

Sözgelimi, alındığı bölgeye göre değerlendirildiğinde balgam, derin trakeal, aspirat, doku, periton sıvısı, safra örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarının tümünün kolistin duyarlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 1. Çalışmaya dâhil edilen klinik örneklerin alındığı bölgeye göre yüzde dağılımı.



Şekil 2. Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında, A) Kolistinin minimum inhibitör konsantrasyon değerine göre bulunan izolat sayısı; B) Kolistine duyarlı ve dirençli izolatların yüzde dağılımı.

Tablo 1. Örneklerin alındığı bölgeye göre kolistin direnç oranları.

	Kolistin dirençli (n)	Kolistin duyarlı (n)	Toplam (n)
İdrar	14	26	40
Kan	14	11	25
Balgam	0	5	5
Beyin omurilik sıvısı	3	0	3
Doku	0	2	2
Püy	1	1	2
Derin trakeal aspirat	0	1	1
Periton sıvısı	0	1	1
Plevra sıvısı	0	1	1
Safra	0	1	1

Tablo 2. Çalışmamızda ve literatürde diğer bazı çalışmalarda saptanan karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında kolistin direnç (ColR) yüzdeleri.

Referans	Yöntem	Değerlendirme kriteri	n	ColR (%)
Bizim çalışmamız	Sıvı mikrodilüsyon	EUCAST	81	39.5
Rojas ve ark., 2017[14]	Sıvı makrodilüsyon, E-test	CLSI ve FDA	246	13.0
Souli ve ark., 2010[20]	E-test	EUCAST	50	14.0
Meletis ve ark., 2011[27]	Sıvı mikrodilüsyon	EUCAST	20	20.0
Samonis ve ark., 2012[28]	E-test	EUCAST	65	24.6
Capone ve ark., 2013[15]	VITEK2, Sıvı mikrodilüsyon	EUCAST	97	36.1
Halaby ve ark., 2013[29]	E-test	EUCAST	134	55.2
Chen ve ark., 2011[30]	Agar dilüsyon	EUCAST	68	4.4

Çalışmamıza dâhil edilen 3 BOS örneğinin tümünde kolistin dirençli izolatlar olduğu belirlenmiştir. İdrar örneklerinde kolistin dirençli izolat oranı %35 olarak belirlenmiştir. Kan örnekleri tek başına değerlendirildiğinde ise, kolistin dirençli izolatlar %56 oranında saptanmıştır (Tablo 1).

TARTIŞMA

Kolistin (Polimiksin E), kuvvetli katyonik polipeptid antibiyotiklerdendir. Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkaritlere bağlanarak hücre membranının bozulmasına ve bakterinin ölümüne neden olur. Kolistinin dâhil olduğu polimiksin grubu antibiyotikler ilk kez 1947 yılında izole edilmiş ancak toksik etkileri nedeni ile kullanımı tercih edilmemiştir[8]. Karbapenem dirençli enterik bakterilerin son yıllardaki hızlı artışı sonucu bu enfeksiyonlarda kolistin kullanımı tek seçenek tedavi olarak yeniden gündeme gelmiştir[3,10].

Klebsiella pneumoniae türlerindeki artan direnç yayılımı tedavi alternatiflerini sınırlandırması nedeni ile önemli bir sorun hâline gelmiştir. Karbapenem dirençli izolatlar bütün beta-laktamlara in-vitro dirençli olup, bu bakterilerde sıklıkla kinolon gruplarına da direnç gözlenmekte ve son seçenek tedavi alternatifi olarak kolistin kullanılabilmektedir[3]. Karbapenem dirençli enterik bakterilerde kolistinin yaygın kullanımı sonucu *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direnci kritik seviyelere ulaşmaya başlamıştır[14,15]. Kolistin direnci kromozomal mutasyonlar sonucu oluşabildiği gibi, plazmid aracılı direnç gelişimi de gözlenebilmektedir[7,11,12]. Plazmid aracılı kolistin direncinden sorumlu olan *mcr-1, mcr-2* ve *mcr-3* genlerinin 2015 ve 2017 yılları arasında tanımlanmış ve horizontal geçişin kolistin direncinin hızlı yayılımındaki rolü fark edilmiştir[9,11,12].

Dünyada farklı referans yöntemlerin kullanılarak yapıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Farklı çalışmalar ve çalışmamızda belirlenen kolistin direnç yüzdesi Tablo 2'de özetlenmiştir. Kolistin duyarlılığı için referans yöntem EUCAST önerilerine

Tablo 3. Türkiye'de çeşitli bildirilerde sunulmuş olan Enterik bakterilerde kolistin direnç (ColR) prevelansı.

Referans	Yöntem	Değerlendirme kriteri	n	ColR (%)
Yiş, 2018 [31]	Sıvı mikrodilüsyon	EUCAST	108	43.8
Arabacı ve ark., 2018 [24]	Phoenix	EUCAST	57	60.0
Yıldız ve ark., 2018 [26]	Sıvı mikrodilüsyon	EUCAST	147	76.2
Çaycı ve ark., 2018 [25]	Sıvı mikrodilüsyon	EUCAST	101	29.7

göre sıvı mikrodilüsyon olarak belirlenmiştir[16]. Bu nedenle literatürde gradient test yönteminin kullanıldığı çalışmalarda farklı düzeyde hata oranları bildirilmektedir[14,17]. Disk difüzyon yöntemi uygulama kolaylığı nedeniyle kolistin duyarlılığında sık kullanılan bir yöntem olmakla birlikte sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında güvenilir olmayan sonuçlar verdiği bilinmektedir[18]. Örnek yoğun laboratuvarlarda bakterilerin hızlı tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılık testleri sıklıkla kullanılmaktadır. Tan ve ark.[19], antimikrobiyal duyarlılık yöntemlerini karşılaştırdıkları validasyon çalışmasında otomatize sistemlerden VITEK 2 ile agar dilüsyon yöntemini karşılaştırmış, VITEK 2'nin kolistin duyarlılığını belirlemede güvenilir olmayan sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada da, kolistin duyarlılığında referans yöntem olan polisorbat-80 ilavesiz sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış ve sonuçlar EUCAST kolistin sınır değerleri tablosuna göre değerlendirilmiştir.

Rojas ve ark.[14] tarafından yapılan çalışmada, 2011-2014 yılları arasında *K. pneumoniae* ile enfekte veya kolonize hastalarda kolistin duyarlılığı 246 hastada araştırılmış ve %13 oranında kolistin direnci saptanmış ve kolistin dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarını yüksek mortalite ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada gradient test ile yapılan kolistin duyarlılık sonuçlarının sıvı dilüsyon yöntemlerine göre %35 hata oranı verdiğini ve güvenilir olmadığı da belirtilmiştir. Souli ve ark.[20], 2007-2008 yılları arasında yoğun bakım servisinde yatan hastalardan izole ettikleri karbapenemaz-2 (KPC-2) üreten 50 *K. pneumoniae* suşunda E-test ile %10 kolistin direnci bildirmişlerdir. Bu yöntemle çalışmaya dâhil edilen suşlarda kolistin MİK 0.125-48 µg/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda saptanmıştır. Çalışmamızda 81 izolatta kolistin direnç oranı %39.5 olarak literatüre göre oldukça yüksek saptanmıştır. Ayrıca kolistin MİK değeri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile <0.0625->64 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda olmak üzere diğer çalışmalara göre daha geniş bir aralıkta bulunmuştur. Bu durum, diğer birçok çalışmanın kolistin duyarlılık testlerinde otomatize sistemleri veya gradient testleri kullanmış olması ile açıklanabilir. Aynı zamanda 2018 yılında izole edilmiş olan yeni izolatlarla yaptığımız çalışmamız kolistin direnci prevelansının yıllar içinde dramatik bir şekilde artmış olduğunu da göstermektedir.

Çalışmamıza benzer bir örneklem büyüklüğü ile ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direnci %36.1 oranında bulunmuştur[15].

Ülkemizde sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da kolistin direnci prevelansını bildiren sınırlı sayıda çalışma vardır. Türkiye'den yapılan çalışmalardan biri olan Kalem ve ark.[21]'nın çalışmasında, karbapenem dirençli 4 *K. pneumoniae* suşunda klonal ilişki incelenmiş aynı zamanda suşların tümü kolistine dirençli bulunmuştur. Guducuoglu ve ark.[22] tarafından yapılan yeni bir çalışmada, karbapenemaz üreten kolistine dirençli *K. pneumoniae* salgını bildirilmiştir. Bu çalışmada, yoğun bakım ünitesinde yatan 6 hastadan izole edilen 7 *K. pneumoniae* suşu klonal olarak çoklu direnç gösteren ST11 tipinde bulunmuş, kolistin ve test edilen diğer tüm antibiyotiklere karşı dirençli bulunmuştur. Yüksek mortalite ile ilişkilendirilmiş olan bu suşlar için enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması gerekliliği vurgulanmıştır.

Türkiye'den yapılan çalışmaları içeren farklı bildirilerdeki direnç oranları Tablo 3'te özetlenmiştir. Kahraman ve ark.[23] retrospektif olarak yaptıkları çalışmada, kök hücre nakli yapılan hastalarda nakil sırasında gelişen enfeksiyonlardan 2012-2018 yılları arasında izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının %20'sinin kolistin dirençli olduğunu saptamıştır. Bu tabloya göre kolistin direnç oranları yakın tarihlerde izole edilen enterik bakterilerde oldukça yüksek bulunmuştur. Diğer çalışmalara göre daha düşük bulunan kolistin direnci daha eski yıllarda izole edilen örneklerinde çalışmaya dâhil edilmiş olması ile açıklanabilir. Daha yakın tarihlerde izole edilen izolatların kullanıldığı çalışmalarda ise direnç oranları daha yüksek bulunmuştur[24-26]. Bu durum kolistin direncinin yıllar içerisinde arttığını ve yüksek yayılım gösterdiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da, oldukça yüksek oranda bulunan kolistin direnci, ilerisi için önlemler alınması gerekliliğini vurgulamaktadır. Kolistinin tek başına yüksek dozlarda kullanımı yerine kullanımda olan diğer antibiyotiklerle sinerjik etkilerinin değerlendirilmesi ve kombinasyon tedavilerinin uygulanması hızla yayılan kolistin direncinin önüne geçebilmek için en uygun seçenek gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Pereira GH, Garcia DO, Mostardeiro M, Fanti KS, Levin AS. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: two-year epidemiologic follow-up in a tertiary hospital. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(1):113-5. https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100019
2. Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? Int J Antimicrob Agents. 2009;33(5):405 e1-7. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.003.
3. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009;9(4):228-36. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4
4. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. Antimicrob Agents and Chemother. 2015;59(10):5873-84. https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15
5. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008;8(3):159-66. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0
6. World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on surveillance. 2014. https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/ (Erişim tarihi: Aralık 2018).
7. World Health Organization. Central asian and eastern european surveillance of anrimicrobial resistance (CAESAR), Annual report. 2018 http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2017/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2017-2018 (Erişim tarihi: Aralık 2018).
8. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis. 2005;40(9):1333-41. https://doi.org/10.1086/429323.
9. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J. Agents of last resort: Polymyxin resistance. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):391-414. https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.005
10. Neuner EA, Yeh JY, Hall GS, et al. Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(4):357-62. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.013
11. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat. 2010;13(4-5):132-8. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.05.002
12. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7
13. Eucast. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, 2017. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf (Erişim tarihi: Aralık 2018)
14. Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory detection and impact on mortality. Clin Infect Dis. 2017;64(6):711-8. https://doi.org/10.1093/cid/ciw805
15. Capone A, Giannella M, Fortini D, et al. High rate of

colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect. 2013;19(1):E23-E30.
https://doi.org/10.1111/1469-0691.12070

16. Eucast. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf (Erişim tarihi: Aralık 2018).
17. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(8):4625-30.
https://doi.org/10.1128/AAC.00868-15
18. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederen BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant Enterobacter cloacae and *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(10):3726-30.
https://doi.org/10.1128/AAC.01406-06
19. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. Clin Microbiol Infect. 2007;13(5):541-4.
https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01708.x
20. Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. An outbreak of infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis. 2010;50(3):364-73.
https://doi.org/10.1086/649865
21. Kalem F, Ergun A, Ertugrul Ö, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Biomed Res. 2016;27(2):368-72.
22. Güdücüoğlu H, Gursoy NC, Yakupoğullari Y, et al. Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1- and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*: High mortality from pandrug resistance. Microb Drug Resist. 2018;24(7):966-72.
https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0173
23. Kahraman S, Ece G, Ocakçı S, Çağırgan S. Hastanemize başvuran hematolojik maligniteli hastalarda allogeneik hematopoetik kök hücre nakli esnasında gelişen enfeksiyonların değerlendirilmesi. XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya; 2018:SS-040.
24. Arabacı Ç, Dal T, Başyiğit T, Genişel N, Durmaz R. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnç mekanizmalarının değerlendirilmesi ve *mcr-1* geninin araştırılması. XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya; 2018:SS-084.
25. Çaycı YT, Hacıeminoğlu K, Birinci A. Karbapenem dirençli enterobacteriaceae izolatlarınıntedavisinde tigesiklin, kolistin, fosfomisin ve gentamisin antibiyotiklerinin etkinliğinin araştırılması. XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya; 2018:SS-109.
26. Yıldız SS, Kaşkatepe B, Şimşek H, Sarıgüzel FM. Fosfomisin çok ilaca dirençli enterobacteriaceae türlerinde çare mi, çaresiz mi? XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, 2018:SS-085.
27. Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. The J Antimicrob Chemother. 2011;66(4):946-7.
https://doi.org/10.1093/jac/dkr007
28. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(5):695-701.
https://doi.org/10.1007/s10096-011-1360-5
29. Halaby T, Al Naiemi N, Kluytmans J, van der Palen J, Vandenbroucke-Grauls CM. Emergence of colistin resistance in *Enterobacteriaceae* after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(7):3224-9.
https://doi.org/10.1128/AAC.02634-12
30. Chen S, Hu F, Zhang X, et al. Independent emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates without colistin treatment. J Clin Microbiol. 2011;49(11):4022-3.
https://doi.org/10.1128/JCM.01233-11
31. Yiş R. Karbapenem dirençli *Enterobacterales* (KDE) izolatlarında kolistin duyarlılığını ne kadar doğru saptıyoruz? XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya; 2018:SS-039.

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):24-29
doi:10.5222/TMCD.2019.024

Araştırma / *Research Article*

Candida parapsilosis'in Ekstrem Koşullara Toleransında Tuz ve Sıcaklık Stres Direncinin Etkisi[§]

Effect of Salt and Temperature Stress Resistance on the Tolerance of Candida parapsilosis to Extreme Conditions

Engin Kaplan*, Macit İlkit, G. Sybren de Hoog*****

*Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin, Türkiye
**Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bölümü, Adana, Türkiye
***Westerdijk Mantar Biyoçeşitlilik Enstitüsü, Utrecht, Hollanda

Alındığı tarih:
26.12.2018
Kabul tarihi:
24.01.2019
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

E. Kaplan 0000-0001-5705-717X
M. İlkit 0000-0002-1174-4182
G. S. Hoog 0000-0002-5344-257X

✉ enginkaplan33@gmail.com

[§] *Bu araştırmanın verileri, 1. Uluslararası Avrasya Mikoloji Kongresi (1st International Eurasia Mycology Congress, 3-5 Temmuz 2017, Manisa)'nde (O-32) sunulmuştur.*

ÖZ

Amaç: *Günümüzde, tüm dünyada, Candida albicans dışı invazif kandidozun önemli bir etkeni Candida parapsilosis'dir. Birbirine yakın üç tür olan C. parapsilosis, C. orthopsilosis ve C. metapsilosis, "Candida parapsilosis grubu" olarak tanımlanmaktadır. Candida parapsilosis; insan florası, çevresel ortamlar ve henüz nedeni açıklanamamış olmakla birlikte, ev-içi ekstrem ortamlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Bu çalışmada, C. parapsilosis'in ev-içi bulaşık ve çamaşır makinelerindeki benzer koşullara karşı tolerans özelliklerinin incelenmesi amaçlandı.*
Yöntem: *Çalışmada, C. parapsilosis (n = 8), C. orthopsilosis (n = 7) ve C. metapsilosis (n = 6) olmak üzere toplam 21 referans kökenin sıcaklık, tuz, pH ve siklohekzimit tolerans özellikleri incelendi.*
Bulgular: *İzolatların tümü 40°C sıcaklıkta üremelerine karşılık; 42°C ve üstü (45°C ve 50°C) sıcaklıklarda üreme görülmedi. Candida parapsilosis, C. metapsilosis ve C. orthopsilosis kökenlerinin tamamının %5-10 NaCl, pH 2.5-10 ve %0.01 siklohekzimit ortamlarına tolerans gösterdikleri belirlendi. Buna karşılık, izolatlardan hiçbirinin pH 12.5 veya %0.1 siklohekzimit ortamlarında üremediği görüldü. Dikkat çekici şekilde, çalışmada incelenen C. parapsilosis grubuna ait tüm kökenlerin %10 NaCl ve %0.01 siklohekzimit içeren ve pH 2.5-10 arası ortamlardan en az birine tolerans gösterebildiği saptandı. Candida parapsilosis, C. metapsilosis ve C. orthopsilosis izolatlarının 45°C'de canlı kalabilme oranları, sırasıyla %50, %16.6 ve %14.2 olarak saptandı. Ayrıca, C. parapsilosis izolatlarının %75'inin %17 NaCl'e tolerans göstermesine karşılık, C. metapsilosis ve C. orthopsilosis izolatlarının bu koşula uyum sağlamadığı görüldü.*
Sonuç: *Candida parapsilosis'in ev-içi aletlerindeki ekstrem koşullara karşı gösterdiği tolerans mekanizmasında termofilik ve halofilik özeliklerinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Candida parapsilosis, ev içi habitat, tolerans*

ABSTRACT

Objective: *Currently, Candida parapsilosis is an emerging cause of non-C. albicans- related invasive candidiasis worldwide. Three phenotypically close species, C. parapsilosis, C. orthopsilosis and C. metapsilosis are defined as "Candida parapsilosis group". Candida parapsilosis is frequently found in human commensal flora, natural environments, and inexplicably, in extreme indoor environments. This study aimed to examine the tolerance characteristics of C. parapsilosis to similar conditions of domestic dishwashing and washing machines.*
Method: *We investigated the thermo-, halo-, pH and cycloheximide tolerance of 21 reference strains of C. parapsilosis (n = 8), C. orthopsilosis (n = 7), and C. metapsilosis (n = 6).*
Results: *All isolates grew at 40°C but showed no growth at temperatures at or above 42°C (45°C and 50°C). All C. parapsilosis, C.metapsilosis, and C. orthopsilosis strains tolerated 5-10% NaCl, pH 2.5-10, and 0.01% cycloheximide. However, the isolates did not grow at pH 12.5 or in the presence of 0.1% cycloheximide. Notably, all the examined isolates of the C. parapsilosis species group can show tolerance at least one of the following conditions as; 10% NaCl, pH 2.5-10, and 0.01% cycloheximide. The survival rates of Candida parapsilosis, C. metapsilosis and C. orthopsilosis isolates at 45°C were 50%,16.6%, and 14.2%, respectively. In addition, although 75% of C. parapsilosis isolates were tolerant to 17% NaCl, C. metapsilosis and C. orthopsilosis isolates were not tolerant to this condition.*
Conclusion: *Thermophilic and halophilic properties of Candida parapsilosis are thought to play an important role in the tolerance mechanism against extreme conditions in household appliances.*

Keywords: *Candida parapsilosis, domestic habitat, tolerance*

GİRİŞ

Candida albicans dışı *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar son 20 yıldır artış göstermekte ve enfeksiyon etkenlerinin görülme sıklığı kayda değer şekilde *C. albicans*'tan *Candida glabrata, Candida parapsilosis* ve *Candida tropicalis*'e doğru kaymaktadır[1]. Günümüzde, *C. parapsilosis* tüm dünyada

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

invazif kandidozun önemli bir etkenidir[2,3]. Ribozomal DNA'nın ITS (Internal transcribed spacer) bölgelerinin sekansları temel alındığında, *C. parapsilosis, Candida orthopsilosis* ve *Candida metapsilosis* türlerinin aynı kökenden gelen üç kriptik tür olduğu fark edilmiştir[4]. Ancak, daha sonra Chen ve ark.[5], bu üç türün virülans, yayılım, antifungal duyarlılık gibi özelliklerinde farklılık gösterdiklerini ve bu nedenle *C. parapsilosis* ve yakın türleri için "tür kompleksi" söyleminin kullanılmasının doğru olmayacağını savunmuşlardır.

Candida parapsilosis evcil hayvanlar, böcekler, toprak ve deniz ekosistemi de dâhil olmak üzere doğada yaygın olarak bulunur[5,6]. Ayrıca, *C. parapsilosis* insanlar dâhil memelilerde flora üyesi olan ve mukoza, deri ve tırnaklardan izole edilebilen bir türdür[5]. *C. parapsilosis* grubunda, *C. parapsilosis* en sık saptanan tür iken, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*'e daha az rastlanır[7,8]. Kullanılmaları sırasında sıcak ve nemli ortamların oluştuğu, özellikle bulaşık[9-12] ve çamaşır[13,14] makinesi gibi, ev içi aletleri, *C. parapsilosis* için habitat işlevi görmektedir. Bu mikro-habitatlar, deterjanlar ile ilişkili oluşan yüksek pH, 60-80°C'ye kadar yükselebilen ve azalıp artan sıcaklık ve özellikle çamaşır makinelerinde kireç birikimini önlemek amacı ile kullanılan yüksek tuz konsantrasyonu[9,10] gibi faktörlerinin bir veya birkaçını barındırır. Buna karşılık, *C. parapsilosis, C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* türlerinin ev-içi ortamlardaki dağılımı konusunda literatür bilgisi sınırlıdır.

Bu çalışmanın amacı, özellikle bulaşık ve çamaşır makineleri gibi ev-içi ekstrem ortamlardaki *C. parapsilosis* varlığından sorumlu koşulların aydınlatılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, referans *C. parapsilosis, C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* kökenlerinin ekstrem ev-içi mikro-çevrelere benzer fizyolojik koşullara olan tolerans düzeyleri incelendi.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

Bu çalışmada, *C. parapsilosis* grubundaki *C. parapsilosis* (n=8), *C. orthopsilosis* (n=7) ve *C. metapsilosis* (n=6) olmak üzere üç türe ait toplam 21 izolat incelendi. İzolat numaraları ve kökenleri Tablo 1' de verilmektedir. İzolatlar, CBS-KNAW Mantar Biyoçeşitlilik Merkezi

Tablo 1. Çalışmada incelenen *Candida parapsilosis* tür grubuna ait suşlar.

Takson İsmi	CBS No	Örnek Türü	İzolasyon	Ülke
Candida parapsilosis sensu stricto	2915	Klinik	-	Norveç
	604	Klinik	-	Porto Riko
	7248	Klinik	Subklinik mastit	Yeni Zelanda
	8836	Klinik	Kan	ABD
	125.41	Çevresel	*Ziziphus mauritiana*	Zimbabve
	1954*	Çevresel	-	İtalya
	2216	Çevresel	Salamura	ABD
	8181	Çevresel	*Nothofagus dombeyii*	Şili
Candida metapsilosis	107.47	Klinik	Tırnak	Belçika
	109.07*	Klinik	-	ABD
	2315	Klinik	Balgam	İtalya
	111.27	-	-	-
	2916	-	-	Norveç
	107.46	-	-	-
Candida orthopsilosis	107.41	Klinik	Tırnak	Belçika
	107.42	Klinik	Tırnak	Belçika
	109.06*	Klinik	Vajinal	ABD
	9894	Çevresel	-	Panama
	107.43	Çevresel	-	ABD
	2212	Çevresel	-	Endonezya
	8825	Çevresel	-	Avustralya
	8181	Çevresel	*Nothofagus dombeyii*	Şili

**Tip suşlar.*

(Westerdijk Mantar Biyoçeşitlilik Enstitüsü, Utrecht, Hollanda)'nden sağlandı. Çalışma öncesinde izolatlar Sabouraud dextrose agar'a (SDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) pasajlandı ve fizyolojik parametreler değerlendirilmeden önce 25°C'de 3 gün inkübe edildi.

Fizyolojik özelliklerin belirlenmesi: Çalışmada, bulaşık ve çamaşır makinelerinin iç yüzeylerine benzer ekstrem koşullar taklit edildi. Kullanılan başlıca stres parametreleri, bu ortamlardaki ani sıcaklık değişimlerinin yanında, çeşitli deterjanlarca oluşabilecek asit-alkali veya tuzluluk ortamları temelinde belirlendi[9-11,14]. Kökenlerin termotoleransı ve pH toleransı SDA'da, halotoleransı NaCl'de ve siklohekzimit toleransı ise 96 kuyucuklu plaklarda Sabouraud dekstroz broth (SDB, Sigma-Aldrich) ortamında incelendi. Kökenlerin termotolerans özellikleri SDA'da 40°C, 42°C, 45°C ve 50°C'de 5 güne kadar inkübe edilerek incelendi. Üremeyen kökenlerin canlılıklarını incelemek için üreme olmayan tüpler 37°C'ye alınarak 5 gün daha inkübe edildi. Kökenlerin pH tolerans özellikleri 2.5, 4, 10 ve 12.5 değerleri için incelendi. Bu amaçla SDB'nin pH'sı 0.1 M HCl ya da 0.1 M NaOH kullanılarak ayarlandı. Kökenlerin halotolerans özellikleri %5, %10 ya da %17 (w/v) NaCl içeren SDB'de incelendi. Siklohekzimit toleransı ise %0.1 ve %0.01 siklohekzimit (Sigma, Steinheim, Germany) içeren SDB'de değerlendirildi. Kökenlerin büyümeleri her gün görsel veya spektrofotometrik (Thermo Scientific MultiScan Go reader, 1510-012, Vankaa, Finlandiya) olarak 405 nm'de takip edildi[15].

BULGULAR

Çalışma izolatları 40°C sıcaklığı tolere edebilmelerine karşılık, 42°C ve üstü sıcaklıklarda (45°C ve 50°C) üreme görülmedi. Buna karşılık, izolatları 42°C'den 37°C'ye alındığında üremeye başladıkları fark edildi. Ayrıca, 45°C'de inkübe edilen sekiz *C. parapsilosis* suşlarından dördü ve birer *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* suşunun 37°C'deki inkübasyonu sonrası canlı kaldıkları belirlendi (Tablo 2). Bütün *C. parapsilosis, C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* suşları %5–10 NaCl, pH 2.5–10 ve %0.01 siklohekzimit ortamlarına tolerans gösterdikleri belirlendi. Buna karşılık, kökenlerden hiçbirinin pH 12.5 ya da %0.1 siklohekzimit ortamlarında üreyemediği görüldü. *C. parapsilosis* izolatlarının %75 (n=6)'inin %17 NaCl ortamını tolere edebildiği, ancak *C. metapsilosis* ya da *C. orthopsilosis* kökenlerinin bu tuzluluk oranına karşı tolerans göstermediği belirlendi (Tablo 3).

Tablo 2. *Candida parapsilosis* tür grubuna ait suşların farklı sıcaklıklardaki üreme özellikleri.

	Sıcaklık (°C)						
	40	**42**	**45**	**50**	**42→37**	**45→37**	**50→37**
C. parapsilosis s. str. (n=8)	+	-	-	-	+	4+,4-	-
C. metapsilosis (n=6)	+	-	-	-	+	1+,5-	-
C. orthopsilosis (n=7)	+	-	-	-	+	1+,6-	-

+, Üreme pozitif; -, Üreme negatif.

Tablo 3. *Candida parapsilosis* tür grubuna ait suşların farklı pH değerleri, tuzluluk ve siklohekzimit konsantrasyonlarındaki üreme özellikleri.

	NaCl (%)			pH				Siklohekzimit (%)	
	5	**10**	**17**	**2.5**	**4**	**10**	**12.5**	**0.01**	**0.1**
C. parapsilosis s. str. (n=8)	+	+	3+,3±,2-	+	+	+	-	+	-
C. metapsilosis (n=6)	+	+	-	+	+	+	-	+	-
C. orthopsilosis (n=7)	+	+	-	+	+	+	-	+	-

+, Üreme pozitif; ± Zayıf üreme; -, Üreme negatif.

Tablo 4. *Candida parapsilosis*'in bulaşık ve çamaşır makinelerindeki izolasyon sıklığı.

Makine tipi	Ülke	Örnek sayısı	Mantar pozitifliği n (%)	*C. parapsilosis* n (%)	Kaynaklar
Bulaşık	Slovenya, Avustralya, Avusturya, Belçika, Brezilya, Kanada, Çin, Hırvatistan, Danimarka, Almanya, Büyük Britanya, İsrail, İtalya, Japonya, Fransa, Güney Afrika, İspanya, ABD	189	117 (62)	16 (8.5)	[9]
	Türkiye	158	28 (17.7)	2 (0.6)	[10]
	Türkiye	937	230 (24.5)	44 (16.6)	[11]
	Slovenya	30	25 (83)	10 (33)	[12]
Çamaşır	Slovenya	70	55 (79)	14 (25.4)	[13]
	Türkiye	99	47 (47.5)	25 (25.3)	[14]

TARTIŞMA

Bu çalışmada, *C. parapsilosis, C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* kökenlerinin yüksek sıcaklık ve tuzluluk, asidik/alkalik koşullar ve siklohekzimit varlığı gibi ekstrem koşullara olan olası tolerans yetenekleri dikkate alınarak fizyolojik özellikleri incelendi. Bulgularımız, giderek önem kazanan bir patojen olan *C. parapsilosis*'in kriptik türleri olan *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* ile karşılaştırıldığında daha yüksek ekolojik adaptasyon yeteneklerinin varlığını ortaya koymaktadır. Bulaşık[9-12] ve çamaşır[13,14] makinelerindeki *C. parapsilosis*, sırasıyla %6.7-33 ve %25.3-25.4 oranlarında bulunmuş ve sıcak su barındıran ev aletlerinin bu fırsatçı mantarları barındırabileceğini göstermiştir (Tablo 4). *Candida parapsilosis* izolatlarının *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* kökenlerinden farklı olarak yüksek sıcaklık ve tuzluluğa karşı gösterdikleri tolerans, insan yapımı çevrelere olan adaptasyon yetenekleri için bir açıklama olabileceğini düşünmekteyiz.

Döğen ve ark.[14] çamaşır makinelerinden izole ettikleri 29 *C. parapsilosis* izolatının 10°C-37°C sıcaklık, pH 4-10 ve %5-10 NaCl ortamlarında üreyebildiğini bildirmişlerdir. Zupančič ve ark.[12], *C. parapsilosis*'in sıklıkla bulaşık makinelerinin kapak ve kapağa yakın lastik kısımlarından izole edilmesini, 45°C ve üzerindeki sıcaklıklarda canlı kalamamalarına bağlamışlardır. Ayrıca, Novak Babič ve ark.[13], çamaşır makinelerinin deterjan gözleri ve kapak plastik bölgelerinden *C. parapsilosis* izole etmişlerdir. Bu adaptasyon yeteneğiyle *C. parapsilosis'in, C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*'e göre insan yapımı çevreler dâhil geniş bir habitatta[16] virülansı daha yüksek bir klonal yayılım gösteriyor olabileceği düşünülmektedir[17].

Candida parapsilosis türünün yanında, termofilik *Exophiala dermatitidis* ve *Exophiala phaeomuriformis* ile mezofilik *Hortaea werneckii* ve *Aureobasidium pullulans* gibi bazı fırsatçı esmer mantar türleri de iyi bilinen halofilik türlerdir[10,18-20]. Esas olarak, *Exophiala* türleri birden fazla ekstrem çevresel koşullara tolerans gösteren "poliekstremotoleran" türler olup, 5-47°C sıcaklık ve 2.5-12.5 pH aralığı ile %0.1 siklohekzimit varlığında üreyebilmektedir[10,21-24]. *C. parapsilosis* ve *E. dermatitidis*'e karşılık, mezofilik *H. werneckii*'nin 35°C'nin üzerinde üreyemediği ve 30°C'de ise daha yavaş ve küçük koloniler oluşturduğu kaydedilmiştir[20]. Halotoleran bir tür olan *A. pullulans*'ın %17 oranına kadar NaCl'li ortamı tolere edebildiği bilinmektedir[19]. Ayrıca, *A. pullulans* var. melanogenum 37°C'de üreyebilirken, diğer varyetelerinin üreyemediği kaydedilmiştir[25].

Bu çalışmada, termofilik ve halofilik özelliklere sahip *C. parapsilosis*'in ekstrem koşullara tolerans gösterebildiği ve bu özelliklerin *C. parapsilosis*'in ev-içi mikro-çevrelerdeki varlığını açıklayabileceği düşünülmektedir. Buna karşılık, çalışılan izolat sayısının görece az olması bu çalışmanın bir eksikliği olabilir. Ekolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılması ve potansiyel mantar patojenlerine karşı önlem almak amacıyla insan yerleşimi olan benzer habitatlar ve ev-içi bölge ve aletler (banyolar, sıcak su ve hava ilişkili ev aletleri vb.)'de de bu mantar türlerinin varlığı ve yayılımı

incelenmelidir. Buna ek olarak, gelecekte yapılacak çalışmalar, *C. parapsilosis*'in insan yapımı bölgeler, evler ve hastanelerde bulunabilen ekstrem mikro-çevrelerdeki varlığının anlaşılmasını sağlayacaktır. Gelecekte bu mantarların yayılımının insan sağlığına olan etkisinin araştırılması kuşkusuz ilgi çekici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. San Miguel LG, Cobo J, Otheo E, Sánchez-Sousa A, Abraira V, Moreno S. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005;26(6):548-52. https://doi.org/10.1086/502582
2. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit Rev Microbiol. 2009;35(4):283-309. https://doi.org/10.3109/10408410903213393
3. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the rospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. PLoS One. 2014;9(7):e101510. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101510
4. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace C*andida parapsilosis* Groups II and III. J Clin Microbiol. 2005;43(1):284-92. https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005
5. Chen M, Zeng J, de Hoog GS, et al. The "species complex" issue in Klinikly relevant fungi: A case study in *Scedosporium apiospermum*. Fungal Biol. 2016;120(2):137-46. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.003
6. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata, Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):288-305. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
7. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis*, in comparison to the closely related species Candida parapsilosis. J Clin Microbiol. 2008;46(8):2659-64. https://doi.org/10.1128/JCM.00803-08
8. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis, C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. J Clin Microbiol. 2009;47(8):2392-7. https://doi.org/10.1128/JCM.02379-08
9. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biol. 2011;115(10):997-1007. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.007
10. Döğen A, Kaplan E, Öksüz Z, Serin MS, Ilkit M, de Hoog GS. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol. 2013;51(5):493-8. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738313
11. Gümral R, Özhak-Baysan B, Tümgör A, et al. Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. Fungal Divers. 2016;76:1-9. https://doi.org/10.1007/s13225-015-0327-8
12. Zupančič J, Novak Babic M, Zalar P, Gunde-Cimerman N. The black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. PLoS One. 2016;11(2):e0148166. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148166
13. Novak Babič M, Zalar P, Ženko B, Schroers HJ, Džeroski S, Gunde-Cimerman N. *Candida* and *Fusarium* species known as opportunistic human pathogens from customer-accessible parts of residential washing machines. Fungal Biol. 2015;119(2-3): 95-113. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.10.007
14. Döğen A, Sav H, Gonca S, et al. *Candida parapsilosis* in domestic laundry machines. Med Mycol. 2017;55(8):813-9. https://doi.org/10.1093/mmy/myx008
15. Sudhadham M, Prakitsin S, Sivichai S, et al. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. Stud Mycol. 2008;61:145-55. https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.15
16. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: A systematic review and meta-analysis. Pediatr Infect Dis J. 2013;32(5):e206-16. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182863a1c
17. Pryszcz LP, Németh T, Gácser A, Gabaldón T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Genome Biol Evol. 2013;5(12):2382-92. https://doi.org/10.1093/gbe/evt185
18. Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog GS, Plemenitas A. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiol Ecol.

2000;32(3):235-40.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00716.x

19. Kogej T, Ramos J, Plemenitaš A, Gunde-Cimerman N. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. J Appl Environ Microbiol. 2005;71(11): 6600-5.
https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6600-6605.2005
20. Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G. *Hortaea werneckii* isolated from silicone scuba diving equipment in Spain. Med Mycol. 2012;50(8):852-7.
https://doi.org/10.3109/13693786.2012.679628
21. Vicente VA, Attili-Angelis D, Pie MR, et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. Stud Mycol. 2008;61:137-44.
https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.14
22. Döğen A, Ilkit M, de Hoog GS. Black yeast habitat choices and species spectrum on high altitude creosote-treated railway ties. Fungal Biol. 2013;117(10):692-6.
https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.07.006
23. Döğen A, Kaplan E, Ilkit M, de Hoog GS. Massive contamination of *Exophiala dermatitidis* and *E. phaeomuriformis* in railway stations in subtropical Turkey. Mycopathologia. 2013;175(5-6):381-6.
https://doi.org/10.1007/s11046-012-9594-z
24. Gümral R, Tümgör A, Saraçlı MA, Yıldıran ŞT, Ilkit M, de Hoog GS. Black yeast diversity on creosoted railway sleepers changes with ambient climatic conditions. Microb Ecol. 2014;68(4):699-707.
https://doi.org/10.1007/s00248-014-0459-5
25. Gostinčar C, Ohm RA, Kogej T,et al. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. BMC Genomics. 2014;15:549.
https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-549

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):30-34
doi:10.5222/TMCD.2019.030

Araştırma / *Research Article*

Strep A Hızlı Antijen Testiyle Grup A Streptokokların Belirlenmesinde İkili Sürüntü Çubuğu Kullanımı Bir Gereklilik mi?§

Is It a Necessity to Use Double Swab in the Detection of Group A Streptococci by the Strep A Rapid Antigen Test?

Mehmet Emin Bulut*, Elif Aktaş*, Gülşah Malkoçoğlu, Vildan Yavuz Özer***, Berna Ünal****, Banu Bayraktar***

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştıma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye
**Halk Sağlığı Laboratuvarı, Kocaeli, Türkiye
***Sağlık Bilimleri Üniversitesi Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van, Türkiye
****Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Boğaz kültürü ve hızlı antijen testleri grup A streptokok (GAS) farenjitinin tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Tanı için örnek alınmasında tekli veya ikili sürüntü çubukları kullanılabilmektedir. Genellikle tek sürüntü çubuğu her iki test için laboratuvara gönderilmekte, önce kültür besiyerine ekimi yapılmakta daha sonra antijen testi için kullanılmaktadır. İkili çubuklar antijen testi ve kültür için aynı anda örnek alımını olası kılması nedeniyle kullanım kolaylığı sunmaktadır ancak maliyeti daha yüksektir. Bu çalışmada amaç, boğaz sürüntü örneklerinde kültür ve antijen testiyle GAS belirlenmesinde ikili sürüntü çubuğunun etkinliğini ve gerekliliğini değerlendirmektir.*
Yöntem: *17.02.2017-27.02.2017 tarihleri arasında laboratuvarımıza ikili sürüntü çubuğuyla (BD BBL CultureSwab EZ II) gönderilen boğaz sürüntü örnekleri prospektif olarak değerlendirilmiştir. Birinci sürüntü çubuğuyla hızlı antijen testi (BD Veritor™ System Strep A Test) pozitif saptanan 100 hasta örneğinin ikinci sürüntü çubuğu önce kültür için kullanılmış, sonrasında aynı çubukla hızlı antijen testi yine çalışılmıştır. Her iki test sonucunda saptanan pozitiflik oranları karşılaştırılmıştır.*
Bulgular: *İkili sürüntü çubuğuyla gönderilen örneklerde 100 antijen pozitifliği belirlenmiş, bu örneklerin 99'unda (%99) kültürde GAS saptanmıştır. Bu 100 örnek kültür için kullanılan ikinci sürüntü çubuğuyla yine test edildiklerinde antijen pozitifliği 76'ya (%76) düşmüştür. Yüz pozitif test sonucunun 76'sının kuvvetli, 24'ünün zayıf bant oluşturduğu gözlenmiştir. Kuvvetli bant oluşturan 76 örneğin 74'ü (%97), zayıf bant oluşturan 24 örneğin ikisi (%8) ikinci çubukla pozitif saptanabilmiştir. Kültür negatif olan tek örneğin ilk çubukla zayıf bant oluşturduğu, ikinci çubukla negatif sonuç verdiği gözlenmiştir.*
Sonuç: *Boğaz sürüntü örneklerinde tek sürüntü çubuğunun hem kültür hem hızlı antijen testi için kullanılması antijen testi pozitifliğini önemli oranda düşürmektedir. İkili sürüntü çubuğu kullanımı inokülüm miktarını artırarak GAS belirlenmesini kolaylaştırmakta ve antijen testinin performansını yükseltmektedir.*

Anahtar kelimeler: *GAS, hızlı antijen testi, boğaz kültürü, ikili sürüntü çubuğu*

ABSTRACT

Objective: *The throat culture and rapid antigen tests are frequently used to diagnose group A beta-hemolytic streptococcal (GAS) pharyngitis. Specimen collection may be carried out by using single throat swabs or by double swabs. Generally, one single throat swab is sent to the laboratory for both tests, it is first used to inoculate culture media and then used for rapid antigen tests. Double swabs provide ease of use by allowing the sample to be taken for both culture and antigen testing at the same time, but it has a higher cost. The aim of the present study was to evaluate the efficiency and necessity of double swabs in detection of GAS by culture and antigen testing.*
Method: *The throat swab specimens sent to our laboratory with double swab (BD BBL CultureSwab EZ II) between 17.02.2017-27.02.2017 were evaluated prospectively. The second swabs of 100 specimens that were found as positive by antigen testing (BD Veritor™ System Strep A Test) with the first swab were first used for culture, and then reused for antigen testing. The positivity rates in both tests were compared.*
Results: *A total of 100 antigen positivities were determined in the samples sent with double swabs. GAS was identified by culture in 99 (99%) of these samples. When these 100 samples were retested with the second swab used for culture, antigen positivity decreased to 76 (76%). Of the 100 positive test results, 76 samples had strong bands while the remaining 24 samples showed a relatively weak reaction. Seventy- four of the 76 samples (97%) that produced strong bands, and two of the 24 samples (8%) that formed weak bands were positive with the second swab. It was observed that the culture- negative sample formed a weak band with the first swab and gave a negative result with the second swab.*
Conclusion: *The use of a single swab for both culture and rapid antigen testing in throat swab specimens significantly reduces the antigen test positivity. Using double swabs could increase the inoculum size and improve the performance of the rapid antigen test facilitating the detection of GAS.*

Keywords: *GAS, rapid antigen test, throat culture, double swab*

Alındığı tarih:
28.11.2018
Kabul tarihi:
22.01.2019
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

M. E. Bulut 0000-0003-2097-3224
E. Aktaş 0000-0003-3087-5425
G. Malkoçoğlu 0000-0001-7159-1360
V. Y. Özer 0000-0001-8269-5712
B. Ünal 0000-0002-3976-875X
B. Bayraktar 0000-0002-3128-0581

✉ eminbulut212@gmail.com

§ *Bu araştırma 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (8-12 Kasım 2017, Antalya)'nde (P-051) sunulmuştur.*

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Akut tonsillofarenjit klinisyenlerin günlük pratiklerinde en sık karşılaştıkları klinik tablolardan birisidir[1]. Yaygın ve sık görülmesi, iş gücünde kayba yol açmasının yanı sıra bakteriyel ve viral etkenlerin ayrımındaki güçlük nedeniyle gereksiz antibiyotik kullanımına neden olmasından ötürü önemli bir sağlık sorunudur[2]. Virüsler akut tonsillofarenjitlerin en sık karşılaşılan etkenleridir ve oluşturdukları enfeksiyonların klinik olarak bakteriyel enfeksiyonlardan ayırt edilmesi zordur. Bakteriyel etkenler arasında en sık görüleni ve önemli olanı *Streptococcus pyogenes* [Grup A streptokoklar (GAS)]'tır. GAS tonsillofarenjitleri en sık 5-15 yaş arasındaki çocuklarda görülür. GAS farenjitinde nonsüpüratif ve süpüratif komplikasyonların gelişmesini önlemek ve klinik iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla antibiyotik tedavisi kesinlikle gereklidir[3,4]. Bu nedenle tonsillofarenjitlerde kesin tanı konulması gereklidir. Klinik semptomlar sıklıkla bakteriyel/viral enfeksiyon ayrımı için yeterli olmamakta, laboratuvar testlerine gereksinim duyulmaktadır[5,6].

GAS farenjitinin tanısında kültür altın standarttır. Bu yöntemin zaman alması nedeniyle hızlı antijen testleri geliştirilmiştir. Uygulaması kolay bu testlerle 15 dk.'dan kısa sürede sonuç alınabilmektedir. Genellikle hızlı antijen testlerinin özgüllükleri kabul edilebilir oranda yüksek (%90-99) bulunurken, kültüre kıyasla duyarlılıkları konusunda çelişkiler mevcuttur[4,6]. Hızlı antijen testlerinin duyarlılık oranlarının değişkenlik göstermesi nedeniyle, hızlı testlerdeki negatif sonuçların kültürle doğrulanması önerilmektedir[4,7,8]. Doğru teknikle ve uygun koşullarda yapılan kültürün duyarlılığı oldukça yüksektir[4]. Bu nedenle özellikle çocuklarda ve akut romatizmal ateş gibi ciddi komplikasyonların yaygın olduğu bölgelerde negatif hızlı antijen test sonuçlarının kültürle doğrulanması eksik tedavinin önlenmesi açısından önemlidir[7].

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda, boğaz sürüntü örneklerinde GAS belirlenmesinde çeşitli hızlı antijen testlerinin etkinliği kültürle karşılaştırılarak değerlendirilmiş, ek olarak kültürde GAS üreme yoğunluğu ile antijen testi sonuçlarının ilişkisi incelenmiştir[8-10]. Üreme yoğunluğu fazla olan olgularda antijen testi sonuçlarının daha yüksek oranda pozitif olduğunun gözlemlenmesi üzerine, direkt olarak örnek alma yöntemi ve inokülüm etkisinin değerlendirilebileceği bir çalışma yapılması planlanmıştır.

Boğaz kültürü ve hızlı antijen testlerinin doğru sonuç vermesi ve uygun tedavi için örneğin doğru şekilde ve miktarda alınması önemli bir adımdır. Hızlı antijen testleri ve kültür için örnek alımında iki ayrı sürüntü çubuğu kullanılabilmektedir. Yaygın olarak tek sürüntü çubuğu önce kültür sonra antijen testi için kullanılmaktadır. Tek seferde hem kültür hem antijen testi için örnek almayı sağlayan birbirine bağlı ikili sürüntü çubuklarıysa kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Ancak, ikili sürüntü çubuğu maliyeti oldukça yüksek olduğundan, hızlı antijen testi ve kültür çalışmalarında tekli sürüntü çubuğu kullanılabilmesi maliyet etkinlik açısından önemlidir. Bu çalışmada amaç boğaz sürüntü örneklerinde GAS belirlenmesinde kültür ve antijen testi için ikili sürüntü çubuğunun etkinliğini ve gerekliliğini değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 17.02.2017-27.02.2017 tarihleri arasında tonsillofarenjit ön tanısıyla (BD BBLTM CultureSwab™ EZ II, Fransa) gönderilen boğaz sürüntü örnekleri prospektif olarak incelenmiştir. Laboratuvarımıza boğaz kültürü ve hızlı antijen testi yapılmak üzere gönderilen örnekler büyük oranda ikili sürüntü çubuğu ile gönderilmektedir. Çalışma periyodunda, boğaz kültürü ve hızlı antijen testi için laboratuvarımıza toplam 503 örnek gönderilmiştir. Çalışmamıza bu süreçte hızlı antijen testi pozitif bulunan 178 örnekten ikili sürüntü çubuğuyla gönderilmiş olup, mesai saatlerinde laboratuvarımıza ulaşan 100 örnek dâhil edilmiştir. Birinci sürüntü çubuğuyla yapılan BD Veritor™ System hızlı Strep A antijen testi (Becton Dickinson, ABD) pozitif saptanan 100 hasta örneğinin ikinci sürüntü çubuğu

önce kültür için kullanılmış, sonrasında aynı çubukla hızlı antijen testi yine çalışılmıştır. Testlerin sonucunda elde edilen pozitiflik oranları karşılaştırılmıştır. Hızlı antijen testinin değerlendirmesi BD Veritor™ System (Becton Dickinson, ABD) okuma cihazında yapılmış olup, gözle değerlendirildiğinde kuvvetli/zayıf bant oluşumu inokülüm etkisinin incelenmesi için ayrıca kaydedilmiştir. Kültür %5 koyun kanlı agarda yapılmış, identifikasyon testleri için BD BBL™ DrySlide™ PYR Kit (Becton Dickinson, USA), lateks aglütinasyon Streptokok Gruplama Test Kiti (Plasmatec, Birleşik Krallık) ve MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımlı gruplarda oranların karşılaştırmaları Mc Nemar analizi ile yapıldı. Sonuçların uyumunu Cohen' Kappa (κ) uyum testi ile analiz edildi. Alfa anlamlılık seviyesi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma 54'ü kadın (%54), 46'sı (%46) erkek olmak üzere hızlı antijen testi pozitif bulunan 100 hastayla yapılmıştır. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımında, 28 hasta (%28) 2-5 yaş arasında, 70 hasta (%70) 6-15 yaş arasında, iki hasta (%2) ise 16 yaş ve üstü grupta yer almıştır. Örneklerin, 91'i acil çocuk polikliniği olmak üzere toplam 98'i (%98) çocuk kliniklerinden, ikisi (%2) erişkin kliniklerinden gönderilmiştir.

Çalışma süresince ikili çubukla gönderilen boğaz sürüntü örneklerinde 100 GAS antijen pozitifliği tespit edilmiş, bu örneklerin 99'unda (%99) kültürde GAS saptanmıştır. Yüz pozitif antijen testi sonucunun 76'sının kuvvetli (%76), 24'ünün (%24) zayıf bant oluşturduğu gözlenmiştir. Antijen testi pozitif 100 örnek önceden kültürde kullanılmış olan ikinci sürüntü çubuğuyla yine test edildiklerinde 76 (%76) örnekte antijen pozitifliği saptanmış; bunlardan 65'i kuvvetli, 11'i zayıf bant oluşturmuştur. Aynı sürüntü çubuğu hem kültür hem hızlı test için kullanıldığında, hızlı antijen testi pozitifliği kültür pozitifliğinden istatistiksel olarak anlamlı düşüktü ($p<0.001$).

İlk çalışmada kuvvetli bant oluşturan 76 örneğin 74'ü (%97), zayıf bant oluşturan 24 örneğin ikisi (%8) ikinci sürüntü çubuğuyla pozitif saptanabilmiştir. İkinci sürüntü çubuğuyla antijen testi negatif saptanan 24 örneğin 22'sinin birinci sürüntü çubuğuyla zayıf bant oluşturduğu gözlenmiştir. Kültür negatif olan tek örneğin ilk sürüntü çubuğuyla zayıf bant oluşturduğu, ikinci sürüntü çubuğuyla negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. Çalışma süresince laboratuvara gelen 503 örnekten dördünde kültür pozitif olduğu halde antijen testi negatif sonuçlanmış; bu örneklerin tekli sürüntü çubuğuyla gönderilmiş olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

GAS tonsillofarenjitinin doğru tanısı ciddi süpüratif ve non-süpüratif komplikasyonların gelişmesini önlemek, semptom rezolüsyonunu hızlandırmak ve bakterinin toplumda yayılmasını önlemek açısından çok önemlidir[7,12]. Akut tonsillofarenjit olgularında hızlı antijen testleri tanıya büyük katkı sunmaktadır. Hızlı antijen testlerinin performanslarını etkileyen en önemli etkenler örneğin alınış şekli ve örnekteki mikroorganizma (inokülüm) miktarıdır[13-15]. İnokulüm miktarının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hızlı antijen testinde iki sürüntü çubuğunun birlikte ekstraksiyonu ile her birinin ayrı ayrı ekstraksiyonu sonrasındaki test sonuçları karşılaştırılmış ve iki sürüntü çubuğunun birlikte ekstraksiyonu ile duyarlılığın %80'den %94'e yükseldiği gösterilmiştir[14]. Bu çalışmanın aksine, Ezike ve ark.[16] iki sürüntü çubuğuna karşı tek sürüntü çubuğunun hızlı antijen testine etkisini araştırdıkları çalışmalarında iki sürüntü çubuğu kullanımının testin duyarlılığını artırmadığını ortaya koymuşlardır. Lasseter ve ark.[17] in vitro ortamda GAS'ın çeşitli dilüsyonlarında beş farklı testin duyarlılığını araştırmış ve inokulüm miktarının artmasının test duyarlılığını arttırdığını göstermişlerdir. Cohen ve ark.[15] bir hızlı antijen testinin duyarlılığını yüksek inokulumda %95, düşük inokulumda ciddi bir düşüşle %40 olarak saptamış, inokulum etkisinin önemini vurgulamışlardır. Bununla birlikte, antijen testlerinin özgüllüğünün %100 olarak değerlendirilebileceği, antijen testi pozitifliği kültür negatifliği durumunda

hastanın tonsilofarenjit olarak kabul edilebileceği bildirilmektedir[18].

Çalışmamızda elde edilen bulgular, boğaz sürüntü örneklerinde tek sürüntü çubuğunun hem kültür hem hızlı antijen testi için kullanılmasının antijen testi pozitifliğini önemli oranda düşürdüğünü ortaya koymuştur. Bunun nedeninin kültür esnasında besiyerine inoküle edilen bakterinin hızlı antijen testi için gerekli inokülüm miktarını azaltması olduğu düşünülmüştür. Zayıf bant oluşturan örneklerde ikinci çubukla pozitiflik oranının [2/24 (% 8)] kuvvetli bant oluşturanlara [74/76 (%97)] göre çok daha düşük olması da inokülüm etkisini düşündürmektedir.

Çalışmamızın sınırlılığı yalnızca bir ticari test kitinin ya da ikili sürüntü çubuğunun test edilmiş olmasıdır. Piyasada başka ticari ürünler de bulunmaktadır ve onlar için burada rapor edildiğinden farklı sonuç alınabilmesi olasıdır. Çalışmamızın kuvvetli yönü ise testlerin karşılaştırmasının aynı boğaz sürüntü örnekleriyle yapılarak test sonuçlarına farklı hasta gruplarındaki bakteri yükü ve örneğin alınış şeklinin etkisini ortadan kaldırmasıdır.

Sonuç olarak, GAS farenjitinin doğru ve hızlı tanısı için örnekteki inokülüm miktarı çok önemlidir. Kültür ve antijen testlerinin birlikte istendiği durumlarda ikili sürüntü çubuğu kullanımı inokülüm etkisini sabit tutarak hızlı testlerin GAS tespitini kolaylaştırmakta, performanslarında artışa neden olmaktadırlar. İkili sürüntü çubukları tekli çubuklara kıyasla yüksek maliyete sahip olmalarına karşın GAS farenjitli olgularda daha fazla erken tanıyı olası kılarak hastalık süresinin kısaltılması, bulaşıcılığın azaltılması ve komplikasyonların önlenmesi ile maliyet etkinlik sağlamaktadır. İkili sürüntü çubuğu kullanımı yanlış negatif antijen testi sonuçlarının minimize edilmesine, böylece klinisyenin GAS farenjiti tanısını doğru koyarak glomerulonefrit, romatizmal kalp hastalığı gibi yaşamı tehdit eden olası komlikasyonların engelenmesine katkı sunacaktır. Ayrıca hızlı antijen testi negatif örneklere kültür yapılmasıyla tanısal duyarlılığın artırılması, eksik tedavinin önlenmesi mümkün olacaktır.

Teşekkür: İstatistik değerlendirmesi için Zübeyde Arat'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Gieseker KE, Roe MH, MacKenzie T, Todd JK. Evaluating the American Academy of Pediatrics diagnostic standard for *Streptococcus pyogenes* pharyngitis: backup culture versus repeat rapid antigen testing. Pediatrics. 2003;111(6 Pt 1):e666-70. https://doi.org/10.1542/peds.111.6.e666
2. Tünger Ö. Akut tonsillofarenjitler. Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2015;2(1):2-7.
3. Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, et al. ESCMID Sore Throat Guideline Group. Guideline for the management of acute sore throat. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(Suppl 1):S1-28. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03766.x
4. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Clin Infect Dis. 2002;35(2):113-25. https://doi.org/10.1086/340949
5. Attia M, Zaoutis T, Eppes S, Klein J, Meier F. Multivariate predictive models for group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis in children. Acad Emerg Med. 1999;6(1):8-13. https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.1999.tb00087.x
6. Edmonson MB, Farwell KR. Relationship between the clinical likelihood of group A streptococcal pharyngitis and the sensitivity of a rapid antigen-detection test in pediatric practice. Pediatrics. 2005;115(2):280-5. https://doi.org/10.1542/peds.2004-0907
7. American Academy of Pediatrics. Group A streptococcal infections. In: Pickering LK (ed). Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases (27th ed). Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2006:610-20.
8. Saygılı N, Bulut E, Deniz R, Dalgıç N, Aktaş E. Boğaz sürüntü örneklerinde A grubu beta-hemolitik streptokokların belirlenmesinde Bionexia Strep A Plus hızlı antijen testinin kullanımı. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2017;47(3):138-45. https://doi.org/10.5222/TMCD.2017.138
9. Deniz R, Aktaş E, Barış A, Bayraktar B. The use of rapid antigen testing and matrix-assisted laser desorption/ ionization-time of flight mass spectrometry in the diagnosis of group A beta-hemolytic streptococci in throat swab samples. Turk J Med Sci. 2018;48(5):939-

44.
https://doi.org/10.3906/sag-1712-101
10. 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(1):73-8.
https://doi.org/10.5578/mb.43448
11. Dajani A, Taubert K, Ferrieri P, Peter G. Shulman S. Treatment of acute streptococcal pharyngitis and prevention of rheumatic fever: a statement for health professionals. Pediatrics. 1995;96(4 Pt 1):758-64.
12. Krober MS, Bass JW, Michels GN. Streptococcal pharyngitis. Placebo-controlled double-blind evaluation of clinical response to penicilin therapy. JAMA. 1985;253(9):1271-4.
https://doi.org/10.1001/jama.1985.03350330069024
13. Fox JW, Cohen DM, Marcon MJ, Cotton WH, Bonsu BK. Performance of rapid streptococcal antigen testing varies by personnel. J Clin Microbiol. 2006;44(11):3918-22.
https://doi.org/10.1128/JCM.01399-06
14. Kurtz B, Kurtz M, Roe M, Todd J. Importance of inoculum size and sampling effect in rapid antigen detection for diagnosis of *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. J Clin Microbiol. 2000;38:279-81.
15. Cohen JF, 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(6):e39085.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039085
16. Ezike EN, Rongkavilit C, Fairfax MR, Thomas RL, Asmar BI. Effect of using 2 throat swabs vs 1 throat swab on detection of group A streptococcus by a rapid antigen detection test. Arch Pediatr Adolesc Med. 2005; 159(9):486-90.
https://doi.org/10.1001/archpedi.159.5.486
17. Lasseter GM, McNulty CA, Richard Hobbs FD, et al. In vitro evaluation of five rapid antigen detection tests for group A beta haemolytic streptococcal sore throat infections. Fam Pract. 2009;26(6):437-44.
https://doi.org/10.1093/fampra/cmp054
18. Cohen JF, Cohen R, Bidet P, et al. Rapid-antigen detection tests for group A streptococcal pharyngitis: revisiting false-positive results using polymerase chain reaction testing. J Pediatr 2013;162(6):1282-4.
https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.050

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):35-40
doi:10.5222/TMCD.2019.035

Araştırma / *Research Article*

Kan Kültürlerinden İzole Edilmiş Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarının Seftarolin, Linezolid ve Vankomisin İn Vitro Duyarlılığının Değerlendirilmesi§

Evaluation of Ceftaroline, Linezolid and Vancomycin in Vitro Susceptibility of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci Strains Isolated from Blood Cultures

Fulya Bayındır Bilman*, Barış Çiçek**

*İzmir Menemen Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye
**İstanbul Esenyurt Necmi Kadıoğlu Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Kan dolaşımı enfeksiyonları hastanede yatan hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu çalışmada, kan kültürlerinde üreyen metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) ve metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokoklar (MRKNS)'da seftarolin, linezolid ve vankomisine duyarlılığın in vitro olarak araştırılması amaçlanmıştır.*
Yöntem: *Çalışmamıza, Ocak 2015-Şubat 2018 arası dönemde kan kültürlerinden izole edilen 50 MRSA ve 50 MRKNS suşu dahil edilmiştir. Aynı hastanın kan kültürlerinden elde edilmiş tek izolat kullanılmıştır. MRSA ve MRKNS izolatlarının identifikasyonu; Gram boyama, katalaz testi, koagülaz testi ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'in önerileri doğrultusunda 30 µg'lık sefoksitin diski ile yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle çalışılmıştır. Vankomisin ve linezolid için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri gradiyent strip difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. Seftarolin için MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.*
Bulgular: *Tüm izolatlar vankomisin (MİK<2 µg/ml) ve linezolid'e (MİK<1 µg/ml) duyarlı bulunmuştur. Seftarolin MRSA izolatlarının 45/50 (%90)'sinde duyarlı tespit edilmiştir. Seftarolinin, MRSA izolatlarında $MİK_{50/90}$ değeri 0.5/1 µg/ml ve MİK aralığı 0.125-2 µg/ml iken; MRKNS'de $MİK_{50}/_{90}$ değeri 0.25/0.5 µg/ml ve MİK aralığı 0.125-2 µg/ml olarak bulunmuştur.*
Sonuç: *Ülkemizde henüz kullanımına başlanmamış 5. kuşak sefalosporin olan seftarolin MRSA ve MRKNS izolatlarında vankomisin ve linezolide yakın bir in vitro etkinlik göstermiştir. Bu bulgular, bu etkenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde seftarolinin iyi bir seçenek olduğunu düşündürmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Seftarolin, MRSA, MRKNS*

ABSTRACT

Objective: *Bloodstream infections are important causes of morbidity and mortality in hospitalized patients. The objective of this investigation was to evaluate the in vitro susceptibilities of ceftaroline, linezolid and vancomycin, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) strains grown in blood cultures.*
Method: *A total of 50 MRSA and 50 MRCoNS strains isolated from blood cultures between January 2015-February 2018, were included in this study. Only one isolate from each patient was included in the study. Bacterial identification was performed by conventional methods (Gram staining, catalase, coagulase testing) and the resistance of the isolates to methicillin was determined using cefoxitin (30 µg) Kirby-Bauer disk diffusion method according to EUCAST susceptibility criteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for vancomycin and linezolid were determined according to the gradient strip diffusion method. Susceptibility testing of ceftaroline was performed by using the broth microdilution method as recommended by CLSI.*
Results: *All isolates tested were found to be susceptible to linezolid (MIC<1 µg/ml) and vancomycin (MIC<2 µg/ml). Ceftaroline was detected to be susceptible in 45/50 (90%) of the MRSA isolates. MIC_{50} and MIC_{90} values of ceftaroline for MRSA were found as 0.5 µg/ml and 1 µg/ml, respectively, with a MIC range of 0.125-2 µg/ml. MIC_{50} and MIC_{90} values of ceftaroline for MRCoNS were found as 0.25 µg/ml and 0.5 µg/ml, respectively, with a MIC range of 0.125-2 µg/ml.*
Conclusion: *The fifth generation cephalosporin, ceftaroline that has not been in use in our country yet, showed a similar in vitro activity as vancomycin and linezolid against MRSA and MRCoNS isolates. These findings suggest that ceftaroline could be a good therapeutic option for the treatment of infections caused by MRSA and MRCoNS.*

Keywords: *Ceftaroline, MRSA, MRCoNS*

Alındığı tarih:
22.12.2018
Kabul tarihi:
20.01.2019
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

F. B. Bilman 0000-0001-7962-6134
B. Çiçek 0000-0002-1027-8394

✉ f_bilman@hotmail.com

§ Bu çalışma 7. Türkiye EKMUD Uluslararası Kongresi (08-13 Mayıs 2018, Antalya)'nde poster olarak (P-46) sunulmuştur.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokoklar (MRKNS) nedeniyle oluşan kan dolaşımı enfeksiyonları günümüzde önemli bir morbidite ve mortalite oranına sahiptir[1]. Glikopeptid direnci ile ilgili güncel çalışma verilerinde dünya genelinde dirençli MRSA suşları bildirilmeye başlanmıştır[2,3]. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise stafilokoklarda vankomisin direnci henüz saptanmamış ancak bazı MRSA suşlarında vankomisine azalmış duyarlılık gösterilmiştir[4]. Vankomisine orta duyarlı *S. aureus* (VISA) suşları ile ilgili verilere bakıldığında ise heterojen VISA (hVISA) izolatları belirlenen çalışmalar mevcuttur[5-7]. In vitro duyarlılık testlerinde vankomisine duyarlı bulunan ancak en az 10^4-10^5'te bir sıklıkta olmak üzere, MİK değeri > 2 µg/mL olan bir subpopülasyon içeren suşlar hVISA olarak tanımlanmaktadır[6].

Günümüzde VISA ve heterojen VISA (hVISA) suşlarının ortaya çıkması, glikopeptid grubu antibiyotiklere alternatif olabilecek başka antimikrobiyallere gereksinim doğurmuştur[8,9]. Oksazolidinon grubunda yer alan linezolidin kullanımı yaygındır[10]. Son yıllarda 5. kuşak sefalosporinlerden olan seftarolin umut vaad eden moleküllerden birisidir. Seftarolinin onay alarak kullanıma girdiği ülkelerde elde edilen sonuçlar çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir[11,12], ancak henüz ülkemizde kullanıma girmemiştir.

Bu çalışmada, MRSA ve MRKNS ile oluşan kan dolaşımı enfeksiyonlarında başlıca tedavi ajanı olan vankomisin ve linezolidin MİK değerlerinin belirlenmesi ve bu izolatlara seftarolinin vitro etkinliğinin saptanması, hastanemizde gelişen direnç yöneliminin izlenerek uygulanacak tedavi yaklaşımlarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 01.01.2015-28.02.2018 arası dönemde İzmir Menemen Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda BACT/ALERT 3D (bioMérieux, Fransa) kan kültürü sisteminde üreme sinyali saptanan kan kültürlerinde üreyen 50 MRSA ve 50 MRKNS izolatı alınmış ve aynı hastanın klinik örneklerinden elde edilmiş tek örnek kullanılmıştır.

MRSA ve MRKNS izolatlarının tanıları; Gram boyama, katalaz testi, koagülaz testi ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'in[13] önerileri doğrultusunda 30 µg'lık sefoksitin diski (Bioanalyse, Türkiye) ile yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır.

Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için stok besiyerinde -20°C'de saklanmış olan MRSA ve MRKNS izolatları %5 koyun kanlı agara (RTA agar, Türkiye) pasajlanmıştır. Öncelikle, vankomisin ve linezolid için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, üreticinin önerileri doğrultusunda gradiyent strip difüzyon yöntemi ile (E-test, bioMérieux, Fransa) belirlenmiştir. Glikopeptidlerde MİK değerlerinin tespitinde EUCAST broth dilüsyon yöntemini önermektedir ancak laboratuvarımızda bu metodu uygulama olanağı araştırma sürecinde mevcut olmadığı için vankomisin MİK değerleri gradient test ile belirlenmiştir. Taze pasajdaki kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklık standardı oluşturacak şekilde süspansiyon hazırlanarak, steril eküvyon ile Mueller-Hinton Agar besiyeri (RTA agar, Türkiye) yüzeyine homojen şekilde yayılmış ve ardından üzerine vankomisin ve linezolid gradient stripleri (E-test, bioMérieux, Fransa) yerleştirilmiştir. Plakların 37°C'de 18-24 saat inkübasyonu sonrasında antibiyotiklere ait ölçülen MİK değerleri kaydedilmiştir.

Seftarolin için MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. Seftarolin-2HCl (LOT numarası: 01FOR01-06-29) toz formu üretici firma olan Astra Zeneca (İngiltere)'dan sağlanmıştır. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ın[14] önerileri doğrultusunda, seftarolin %100'lük dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözdürülmüş ve %0.085 steril serum fizyolojik içerisinde son konsantrasyonda %30 DMSO olacak şekilde sulandırılmıştır. Daha sonra Mueller Hinton sıvı besiyeri içeren steril U tabanlı 96 kuyu-

cuklu polistren plakların kuyucuklarına seri dilüsyonları 0.125-64 µg/ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Taze pasajdaki kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklık standardı oluşturacak şekilde süspansiyon hazırlanarak son inokulüm konsantrasyonu $5x10^5$ cfu/ml olacak şekilde, 1/100 oranında sulandırılıp kuyucuklara eklenmiştir. Tüm plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Seftarolin MİK değeri <= 1 µg/ml, linezolid MİK değeri <=4 µg/ml olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir. MRSA izolatları için vankomisin MİK değeri <=2 µg/ml ve MRKNS izolatları için vankomisin MİK değeri <= 4 µg/ml olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir.

Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

BULGULAR

Tüm izolatlar vankomisin (MİK<2 µg/ml) ve linezolide (MİK<1 µg/ml) duyarlı bulunmuştur. Elde edilen $MİK_{50/90}$ değerleri Tablo 1'de yer almaktadır.

Seftarolin için MRSA izolatlarının 45/50 (%90)'sinde duyarlılık belirlenmiştir (Tablo 2). Seftarolinin, MRSA izolatlarında $MİK_{50/90}$ değeri 0.5/1 µg/ml ve MİK aralığı 0.125-2 µg/ml'dir. MRKNS'de (koagülaz negatif stafilokoklarda seftarolin için MİK sınır değerleri belirlenmemiş olmakla birlikte, *S. aureus* için geçerli sınır değerlerine göre yorum yapılmıştır) $MİK_{50/90}$ değeri 0.25/0.5 µg/ml ve MİK aralığı 0.125-2 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 2. MRSA ve MRKNS izolatlarında seftarolin'in MİK değerleri.

	µg/ml				
Bakteri (n)	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**
MRSA	6	17	18	4	5
MRKNS	5	24	18	2	1
S. aureus ATCC 29213	X				

MRSA: Metisilin-dirençli S. aureus; MRKNS: Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok; X: MIK değeri

TARTIŞMA

Tüm dünyada hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların sıklıkla etkeni olan stafilokoklar, yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır[15]. MRSA ve MRKNS enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin başta olmak üzere glikopeptidler tercih edilen antibiyotiklerdir ve ciddi enfeksiyonların tedavisinde uzun dönemde başarılı klinik sonuçlar alınmıştır[16,17]. Ancak, 1990'lı yılların sonlarından itibaren klinik araştırmalarda vankomisine azalmış duyarlılık veya direnç gösteren *S. aureus* izolatları bildirilmiştir[18,19]. Polonya'da bir çalışmada sağlık bakımı ilişkili MRSA izolatlarının 11/600'ünde vankomisin direnci belirlendiği bildirilmiştir[2]. Tahran'da 1789 *S. aureus* izolatı incelendiğinde 4 VRSA, 2 VISA bulunmuştur[3]. Türkiye'de ilk hVISA suşu MRSA izolatlarında 1998 yılında Gülay ve ark.[20] tarafından

Tablo 1. Stafilokok suşları için vankomisin, linezolid ve seftarolin MİK değerleri.

		MİK (µg/ml)			
Mikroorganizma (n)	**Antibiyotik**	**$MİK_{50}$**	**$MİK_{90}$**	**Aralık**	**Duyarlılık (%)**
MRSA (50)	Vankomisin	0.25	0.5	0.125-1	100
	Linezolid	0.5	1	0.5-2	100
	Seftarolin	0.5	1	0.125-2	90
MRKNS (50)	Vankomisin	0.5	1	0.125-1	100
	Linezolid	0.5	1	0.25-1	100
	Seftarolin*	0.25	0.5	0.125-2	98**

MRSA: Metisilin dirençli S. aureus, MRKNS: Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon
** EUCAST'e göre seftarolin MİK değerleri S. aureus için belirlenmiştir.*
*** Seftarolinin ≤1 µg/ml konsantrasyonlarında MRKNS izolatlarının %98'i inhibe olmuştur.*

bildirilmiştir ve mikrodilusyon metoduyla yaptıkları çalışmada hVISA oranı %5.3 bulunmuştur. Aktaş ve ark.[21] vankomisin $MİK_{50/90}$ değerini araştırdıkları çalışmalarında, 390 MRSA izolatında 1 µg/ml olarak belirlemişlerdir. Bu izolatlar arasında VISA suşuna rastlanmamıştır. Yıldız ve ark.[22] Türkiye'de farklı bölgelerden 12 hastanede izole edilmiş 397 MRSA izolatında vankomisin ve linezolide direnç saptamamışlardır. Kuşçu ve ark.[4] metisiline dirençli stafilokoklar arasında, koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşlarında VIS ve hVIS oranlarını sırasıyla %9.8 (4/41) ve %2.4 (1/41) olarak bulurken; *S. aureus* suşlarında sırasıyla %0.9 (1/107) ve %0.9 (1/107) olarak belirlemişlerdir. Mirza ve ark.[5] da 94 pediyatrik hastadan izole edilmiş MRSA suşunu inceledikleri çalışmada %21.3'ünde hVISA belirlemişlerdir. Çalışmalarda elde edilen farklı prevalans oranlarının nedeni kullanılan yöntemlerin farklı olması ile açıklanabilir. Dünya genelinde benzer araştırma sonuçları değerlendirildiğinde bu durum, glikopeptid kullanımı sırasında yetersiz klinik iyileşmeyle ilişkilendirildiğinden tedavide yeni ajanların kullanılması eğilimini ortaya çıkarmıştır. Linezolid de invaziv MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisine alternatif olarak öne çıkan antibiyotiklerdendir.

Stafilokoklarda linezolid direnci oldukça enderdir. Persistan bakteriyemilerin tedavisinde vankomisine benzer sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir[10]. Yapılan çeşitli sürveyans araştırmalarında linezolid direnci *S. aureus* için %0.05-0.14 arasında, KNS için %1.4-2 arasında bildirilmiştir[23,24]. Ender olsa da yoğun bakım ünitesinde linezolide dirençli *S. aureus* ve linezolid ve metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis* salgınları bildirilmiştir[25,26]. Dokutan ve ark.[27] yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli örneklerinde üreyen 125 KNS izolatı içinde kanda üreyen 3 suşta (%2,4) linezolid direnci saptamışlardır. Ertem ve ark.[28] ile Ağuş ve ark.[29] da çalışmalarında stafilokok izolatlarında linezolide direnç belirlemediklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kan kültürlerinde üreyen MRSA ve MRKNS izolatları arasında linezolide direnç saptanmamıştır. Bu durum linezolidin metisiline dirençli stafilokoklar ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde halen uygun bir seçenek olduğu görüşünü desteklemektedir.

Sefalosporin grubu antibiyotiklerin 5. kuşak yeni üyelerinden olan seftarolin MRSA suşlarının yanısıra VISA suşlarına da bakterisidal etkili olarak rapor edilmektedir[30]. Seftarolin'in ön ilaç formu olan seftarolin fosamil, 2010 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay almıştır. MRSA'ya karşı seftarolinin aktivitesi, penisilin bağlayıcı proteinlere olan yüksek afinitesine, özellikle de PBP2a'nın transpeptidaz bölgesi yakınında allosterik bir alana karşı afinitesine bağlıdır. Seftarolin VISA ve hVISA suşlarına karşı da in vitro etkilidir[11]. MRSA bakteriyemilerinin tedavisinde seftarolinin kullanımı için veriler retrospektif olgu serileri ile sınırlıdır. Bir çalışmada MRSA'nın etken olduğu kan dolaşımı enfeksiyonu tanısı alan 123 hastanın %78.3'ünde seftarolin ile klinik başarı elde edildiği bildirilmiştir[31]. Bununla birlikte, bu çalışmada *S. aureus* izolatlarında seftaroline direnç %2.9 oranında belirtilmiştir. Ağır kliniği olan MRSA enfeksiyonlarındaki başarı oranları üzerine yayınlanmış 22 makalenin sonuçları değerlendirildiğinde toplam 379 hastada ortalama klinik kür %74 olarak görülmüştür[32]. Farklı çalışmalarda elde edilen in vitro duyarlılık oranları da %93.3-94 olarak bildirilmektedir[33,34]. Sader ve ark.[35] seftarolinin 9679 MRSA izolatının %97.2'sini MİK değeri ≤1 µg/ml'de, %100'ünü ise MİK değeri ≤2 µg/ml'de inhibe ettiğini göstermişlerdir. Farrell ve ark.[36] 8469 *S.aureus* izolatında seftaroline duyarlılığı %98, $MİK_{50/90}$ değerlerini de 0.5/1 µg/ml olarak belirlemişlerdir. Mengeloğlu ve ark.[37] ise MRSA izolatlarında seftaroline %94.3 duyarlılık ve $MİK_{50/90}$ için 0.5/1 µg/ml sonuçlarını rapor etmişlerdir. Bizim çalışma verilerimiz de bu araştırmalar ile uyumlu bulunmuştur. MRKNS izolatlarında seftarolinin antimikrobiyal aktivitesini araştıran bir çalışmada, seftarolinin ≤1µg/ml konsantrasyonlarında izolatların %98.7'sini inhibe ettiği gösterilmiştir[38]. Bir diğer araştırmada ise MRKNS izolatlarında $MİK_{50/90}$ için 0.25/0.5 µg/ml değerleri elde edilmiştir[39]. Bizim çalışma verilerimizde de benzer şekilde seftarolin MRKNS izolatlarında güçlü aktivite göstermiştir.

MRSA bakteriyemileri etken bakterilerin hızlı belirlenmesini, kaynak kontrolünü ve aktif antimikrobiyal tedaviye hızlı başlanmasını gerektirir. Vankomisin, MRSA bakteriyemilerinde ilk sırada tercih edilen başlangıç antibiyotik olmaya devam etmektedir. Ancak rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında hVISA saptanması mümkün olmadığından tedavi izleminde olası başarısızlığı önlemek için alternatif tedaviler de düşünülmelidir. Alternatif tedavi amacıyla linezolid, daptomisin ve tigesiklin kullanımı sıklıkla önerilmekle birlikte, ülkemizde henüz kullanıma girmemiş yeni bir molekül olan seftarolin için bakterilerin duyarlılığı konusuyla ilgili çalışmalara gereklilik olduğu ve tüm anti-MRSA antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin takip edilmesinin yararlı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Er H, Aşık G, Yoldaş Ö, Demir C, Keşli R. Kan kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2015;45(1):48-54. https://doi.org/10.5222/TMCD.2015.048
2. Szymanek-Majchrzak K, Mlynarczyk A, Mlynarczyk G. Characteristics of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients of three teaching hospitals in Warsaw, Poland. Antimicrob Resist Infect Control. 2018;7:105. https://doi.org/10.1186/s13756-018-0397-y
3. Shekarabi M, Hajikhani B, Salimi Chirani A, Fazeli M, Goudarzi M. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples: A three year study in Tehran, Iran. PLoS One. 2017;12(8):e0183607. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183607
4. Kuşcu F, Öztürk DB, Gürbüz Y, Tütüncü EE, Şencan İ, Gül S. Metisiline dirençli stafilokoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2011;45(2):248-57.
5. Mirza HC, Sancak B, Gur D. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and heterogeneous VISA among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish University Hospital. Microbial Drug Resistance. 2015;21(5):537-44. https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0048
6. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. J Clin Microbiol. 2011;49(1):177-83. https://doi.org/10.1128/JCM.01128-10
7. Sancak B, Yagci S, Gür D, et al. Vancomycin and daptomycin minimum inhibitory concentration distribution and occurrence of heteroresistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates in Turkey. BMC Infect Dis. 2013;13:583. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-583
8. Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2014;312(15):1552-64. https://doi.org/10.1001/jama.2014.6364
9. Choo EJ, Chambers HF. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Infect Chemother. 2016;48(4):267-73. https://doi.org/10.3947/ic.2016.48.4.267
10. Park HJ, Kim SH, Kim MJ, et al. Efficacy of linezolid-based salvage therapy compared with glycopeptide-based therapy in patients with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. J Infect. 2012;65(6):505-12. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.08.007
11. Espedido BA, Jensen SO, van Hal SJ. Ceftaroline fosamil salvage therapy: an option for reduced-vancomycin-susceptible MRSA bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2015;70:797-801. https://doi.org/10.1093/jac/dku455
12. Burnett YJ, Echevarria K, Traugott KA. Ceftaroline as salvage monotherapy for persistent MRSA bacteremia. Ann Pharmacother. 2016;50(12):1051-59. https://doi.org/10.1177/1060028016664361
13. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. http://www.eucast.org (Erişim tarihi: Aralık 2018)
14. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2016. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
15. Öncül O. Vankomisin ve teikoplanin öyküsü. ANKEM Derg. 2010;24(Suppl 2):S101-9.
16. Azap ÖK, Timurkaynak F, Oruç E, Togan T, Arslan H. Hastane infeksiyonlarından izole edilen stafilokok suşlarında vankomisin ve teikoplanin minimum inhibitör konsantrasyonlarının yedi yıl öncesi ile karşılaştırılması. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 2006;10:196-200.
17. Khatib R, Jose J, Musta A, et al. Relevance of vancomycin-intermediate susceptibility and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2011;66(7):1594-9. https://doi.org/10.1093/jac/dkr169
18. Graber CJ, Wong MK, Carleton HA, Perdreau-Remington F, Haller BL, Chambers HF. Intermediate vancomycin

susceptibility in a community-associated MRSA clone. Emerg Infect Dis 2007;13(3):491-3. https://doi.org/10.3201/eid1303.060960
19. Çıkman A, Aydın M, Gülhan B, et al. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının vankomisn duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2015;49(2):240-8. https://doi.org/10.5578/mb.9230
20. Gülay Z, Atay T, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. 13. Antimikrobik ve Kemoterapi Kongresi (1-5 Haziran 1998, Manavgat, Antalya), ANKEM Derg. 1998;12(2):101.
21. Aktaş E, Mengeloğlu FZ, Külah C, Beğendik Cömert F. Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2010;44(2):339-41. https://doi.org/10.1086/650574
22. Yıldız Ö, Çoban AY, Şener AG, et al. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014;13:44. https://doi.org/10.1186/s12941-014-0044-2
23. Armin S, Rouhipour A, Fallah F, Rahbar M, Ebrahimi M. Vancomycin and linezolid resistant *staphylococcus* in hospitalized children. Arch Pediatr Infect Dis. 2013;1(1):4-8. https://doi.org/10.5812/pedinfect.5190
24. Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. J Antimicrob Chemother. 2013;68(1):4-11. https://doi.org/10.1093/jac/dks354
25. Morales G, Picazo JJ, Baos E, et al. Resistance to linezolid is mediated by the cfr gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2010;50(6):821-5. https://doi.org/10.1086/650574
26. Seral C, Sáenz Y, Algarate S, et al. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. Int J Med Microbiol. 2011;301(4):354-8. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.11.001
27. Dokutan A, Hacıseyitoğlu D, Çağ Y, et al. Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda linezolid direnci ve antibiyotik duyarlılıkları. Ortadoğu Tıp Dergisi 2017;9(1):19-23. https://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.293147
28. Ertem GT, Öztürk B, Hatipoğlu ÇA. In vitro susceptibilities of *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolates to linezolid, daptomycin, teicoplanin and fusidic acid. Turkiye Klinikleri J Med Sci. 2013;33(6):1381-7. https://doi.org/10.5336/medsci.2012-33360
29. Ağuş N, Özkalay N, Cengiz A, Vatansever N. Linezolid susceptility in *Staphylococcus* strains. İzmir Tepecik Hast Derg. 2006;16(2):87-9. https://doi.org/10.5222/terh.2006.38107
30. Saravolatz LD, Stein GE, Johnson LB. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2011;52(9):1156-63. https://doi.org/10.1093/cid/cir147
31. Casapao AM, Davis SL, Barr VO, et al. Large retrospective evaluation of the effectiveness and safety of ceftaroline fosamil therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(5):2541-46. https://doi.org/10.1128/AAC.02371-13
32. Cosimi RA, Beik N, Kubiak DW, Johnson JA. Ceftaroline for severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A systematic review. Open Forum Infect Dis. 2017;4(2):ofx084. https://doi.org/10.1093/ofid/ofx084
33. Gaikwad V, Gohel T, Panickar S, Chincholkar V, Mangalkar S. In vitro activity of ceftaroline: A novel antibiotic against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Indian J Pathol Microbiol. 2016;59(4):496-8. https://doi.org/10.4103/0377-4929.191798
34. Şanal L, Yılmaz N, Uludag H, et al. Detection of synergistic antimicrobial activities of ceftaroline, telavancin, daptomycin, and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in intensive care units, Jundishapur J Microbiol. 2018;11(11):e66445. https://doi.org/10.5812/jjm.66445
35. Sader HS, Mendes RE, Streit JM, Flamm RK. Antimicrobial susceptibility trends among Staphylococcus aureus isolates from U.S. hospitals: Results from 7 years of the ceftaroline (AWARE) surveillance program, 2010 to 2016. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(9):e01043-17. https://doi.org/10.1128/AAC.01043-17
36. Farrell DJ, Castanheira M, Mendes RE, Sader HS, Jones RN. In vitro activity of ceftaroline against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*: a review of published studies and the AWARE Surveillance Program (2008-2010). Clin Infect Dis. 2012;55(S3):S206-14. https://doi.org/10.1093/cid/cis563
37. Mengeloğlu FZ, Taş T, Koçoğlu E, et al. Seftrolinin MRSA izolatlarına in vitro etkinliği. Mikrobiyol Bul. 2013;47(4):677-83. https://doi.org/10.5578/mb.5479
38. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Streit JM, Mendes RE, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftaroline and comparator agents when tested against numerous species of coagulase-negative *Staphylococcus* causing infection in US hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85(1):80-4. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.010
39. Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftaroline tested against staphylococci with reduced susceptibility to linezolid, daptomycin, or vancomycin from U.S. hospitals, 2008 to 2011. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(7):3178-81. https://doi.org/10.1128/AAC.00484-13

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):41-46
doi:10.5222/TMCD.2019.041

Araştırma / *Research Article*

Tedavi Başarısızlığı Olan Kronik HBV Hastalarında Nükleoz(t)id Direnç Mutasyonları§

Nucleos(t)ide Resistance Mutations in Chronic HBV Patients with Treatment Failure

Nafia Canan Gürsoy*, Barış Otlu*, Yusuf Yakupoğulları*, Özkan Yener*, Yaşar Bayındır**
Murat Harputluoğlu*, Mehmet Sait Tekerekoğlu***

*İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye
**İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye
***İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

Alındığı tarih:
07.02.2018
Kabul tarihi:
25.02.2019
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

N. C. Gürsoy 0000-0003-2425-9247
B. Otlu 0000-0002-6220-0521
Y. Yakupoğulları 0000-0002-5545-3467
Ö. Yener 0000-0002-8178-4681
Y. Bayındır 0000-0003-3930-774X
M. Harputluoğlu 0000-0002-9415-147X
M. S. Tekerekoğlu 0000-0001-7284-3427

✉ cananatesgursoy@yahoo.com

§ *Bu çalışma verilerinin bir bölümü 03-04/03/2017 tarihleri arasında İstanbul'da gerçekleştirilen uluslararası Viral Hepatitis Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.*

ÖZ

Amaç: *Hepatit B enfeksiyonu aslında tedavi edilebilir bir hastalık değildir ve amaç yalnızca viral replikasyonun baskılanması olup, bu nedenle de çoğu kez yaşam boyu tedavi gerektirir. Uzun süreli antiviral tedavi beraberinde dirençli mutant virüslerin ortaya çıkışına neden olmaktadır. Nüleoz(t)id analoglarının ana hedef bölgesi olan revers transkriptaz gen bölgesindeki mutasyonlar tedavideki en büyük sorundur. Bu çalışmada, kronik hepatit B tedavi başarısızlığı gösteren hastalardaki nükleoz(t)id direnç mutasyonlarının restrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.*
Yöntem: *Bu çalışmada, 2006-2018 yılları arasında, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi çeşitli kliniklerinde takip edilen ve tedavi başarısızlığı gösteren, toplam 120 kronik hepatit B hastasına ait HBV ilaç direnci sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. İlaç direncinin belirlenmesinde, ticari ters hibridizasyon temelli testler ve pirosekanslama yöntemi kullanılmıştır.*
Bulgular: *Çalışmaya dâhil edilen 120 hastanın yaklaşık %52'sinde tekli ve %48'inde çoklu baz mutasyonu belirlenmiştir. Çoğunluğu lamivudin/telbivudin direncinden sorumlu olmak üzere, rtA181T/V ve rtN236T gibi adefovir direncine neden olan çeşitli primer mutasyonların yanı sıra rtL180M, rtL80V/I ve rtV173L gibi kompensatuvar mutasyonlar da saptanmıştır. Tekli baz mutasyonlarından en sık rtM204V/I (%34.16) ve çoklu baz mutasyonları içerisinde ise en sık rtM204V/I+rtL180M (%18.33) görülmüştür.*
Sonuç: *HBV direnç mutasyonlarının uzun süreli ve kalıcı olarak izlenmesi gerekmektedir. Özellikle tedavi başarısızlığı gibi direnç düşünüldüğü durumlarda daha geniş çaplı mutasyon analizlerinin yapılması ve tedavi rejimlerinin bu mutasyonların varlığına bağlı olarak sürekli güncellenmesi gerekmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Hepatit B, antiviral direnç, mutasyon*

ABSTRACT

Objective: *Hepatitis B infection is not actually a curable disease, and the goal is only repression of viral replication and therefore often requires lifelong treatment. Long-term antiviral therapy leads to the emergence of resistant mutant viruses. Mutations in the reverse transcriptase gene region, which is the main target region of the nuleos(t)ide analogues, is the biggest problem in the treatment. The aim of this study was to evaluate the nucleos(t)ide resistance mutations in patients with chronic hepatitis B (CHB) treatment failure.*
Method: *In this study; the results of HBV drug resistance of 120 patients with CHB who were followed-up in various clinics of Inonu University Medical Faculty between 2006-2018 were evaluated retrospectively. In determining the drug resistance; commercial reverse hybridization-based tests and pyrosequencing method were used.*
Results: *Approximately 52% of single and 48% of multiple base mutations were detected in 120 patients included in the study. In addition to various primary mutations leading to adefovir resistance such as rtA181T/V and rtN236T, compensatory mutations such as rtL180M, rtL80V/I and rtV173L have also been found most of which are responsible for lamivudine/telbivudine resistance. rtM204V/I (34.16%) was the most common among single base mutations and rtM204V/I+rtL180M (18.33%) was the most common among multiple base mutations.*
Results: *HBV resistance mutations should be monitored long-term and permanently. Especially in cases such as treatment failures suggestive of the presence of resistance, more extensive mutation analysis should be performed and treatment regimens should be continuously updated depending on the presence of these mutations.*

Keywords: *Hepatitis B, antiviral resistance, mutation*

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Klinik olarak iyileşen akut hepatit B'nin en önemli komplikasyonu kronik hepatit B'dir. Kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonunun önlenmesinde yaklaşık otuz yıldır hepatit B aşısı dünya genelinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Aşılama sayesinde görülme sıklığında azalma kaydedilmesinin yanında, yeni antiviral tedavilerin geliştirilmesi ve tedaviye erişilebilirliğin artması sayesinde son dönem karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinomaya ilerlemeler engellenmeye çalışılmaktadır[1]. Ancak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2017 global hepatit raporuna[2] göre; yaklaşık 257 milyon kişinin hepatit B virüs (HBV) taşıyıcısı olduğu, 2015 yılında çoğu siroz ve hepatoselüler kanser gibi hepatit B'nin uzun dönem komplikasyonları nedeniyle 887 bin ölüme neden olduğu bildirilmiştir.

Hepatit B virüs enfeksiyonu spesifik olarak tedavi edilebilir bir hastalık değildir ve KHB yönetiminde temel amaç viral replikasyonun baskılanması olup, bu nedenle de çoğu kez yaşam boyu tedavi gerektirmektedir. Tedavi sayesinde siroz progresyonu yavaşlatılabilir, karaciğer kanser insidansı azaltılabilir ve uzun süreli sağkalım sağlanabilir[2]. Pegile interferon alfa-2a ve 2b gibi immün-modülatörler ile birlikte lamivudin (LAM), adefovir (ADV), entekavir (ETV), tenofovir (TNF) ve telbivudin (Ldt) gibi nüleoz(t)id analogları (NA) KHB enfeksiyon tedavisinde ülkemizde mevcut olan ve kullanım onayı almış ilaçlardır[3]. Nüleoz(t)id analogları, viral replikasyonun ana enzimatik aktivite bölgesi olan revers transkriptaz (RT) inhibitörü olarak işlev görmektedir. Viral polimerazın çeşitli bölgelerindeki mutasyonlar tedavideki en büyük sorundur. Çünkü bu mutasyonlar RT'nin konformasyonel yapısını değiştirmekte ve bağlanmalarını engelleyerek NA'ların etkinliğini azaltmaktadır[4]. Mutasyonların neden olduğu genotipik direnç, viral polimerazın spesifik pozisyonlardaki sekans varyasyonlarının değerlendirildiği çeşitli ticari testlerle tespit edilebilmektedir. Bu amaçla kullanılabilecek mevcut tanı yöntemleri arasında; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleri gelmektedir[5]. Tedavi-naif hastalarda HBV ilaç direnç mutasyonları ender olduğundan dolayı direnç testinin; özellikle tedaviye yanıtsızlık durumunda veya geçmiş tedavi tecrübesi olan, devam eden NA tedavisine rağmen viremi görülen ve tedavi sırasında virolojik kırılma (breakthrough) olan hastalarda yapılması önerilmektedir[5,6]. Bu çalışmada KHB tedavi başarısızlığı gösteren hastalardaki NA direnç mutasyonlarının restrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, 2006-2018 yılları arasında, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi'ndeki çeşitli kliniklerce takip edilen ve tedavi başarısızlığı gösteren KHB hastalarına ait HBV ilaç direnci sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Yaklaşık 12 yıllık sürede toplam 120 hastaya ait direnç testi sonucu incelenmiştir.

Hastalara ait serum örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla 2006-2014 yılları arasında kolon temelli ekstraksiyon yöntemi (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen, Hilden, Almanya) ve 2014 yılından itibaren manyetik partikül teknolojisinin kullanıldığı otomatize ekstraksiyon sistemi (QIAsymphony SP, Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

İlaç direncinin belirlenmesinde polimeraz gen bölgesindeki mutasyonlar hazır ticari sistemler kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 2006-2014 yılları arasında ticari ters hibridizasyon temelli Inno Lipa HBV DRv2 ve Inno Lipa HBV DRv3 (Innogenetics, Belçika) testleri ve 2014-2018 yılları arasında ise pirosekanslama (Pyromark, Qiagen, Almanya) testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. Pirosekans testi ile HBV polimeraz (pol) geninin rtI169, rtV173, rtL180, rtA181, rtT184, rtA194, rtS202, rtM204, rtN236 ve rtM250 kodonlarındaki mutasyonlar belirlenebilmektedir. Bu bölgeler içerisinde rtL80, rtL180, rtA181, rtM204, rtN236 bölgeleri INNO-LiPA testi version 2 ile ve rtT184, rtA194, rtS202, rtM250 bölgeleri ise INNO-LiPA testi version 3 ile taranabilmektedir. Pirosekanslamada ters-hibridizasyon teknikle-

Tablo 1. Çalışmada belirlenen tekli ve çoklu baz mutasyonlarının dağılımı ve olası nükleoz(t)id analoglarına direnci.

Mutasyon	Primer ve kompensatuvar ilaç direnci[3,6-8]	Hasta sayısı n (%)
Tek Baz Mutasyonu		
rtM204V/I	LAM/Ldt	41 (34.16)
rtL180M	LAM/Ldt (Kompensatuvar)	8 (6.66)
rtA181T/V	LAM/ADV	7 (5.83)
rtL80V/I	LAM (Kompensatuvar)	3 (2.5)
rtN236T	ADV	3 (2.5)
Çoklu Baz Mutasyonu		
rtM204V/I+rtL180M	LAM/Ldt (Kompensatuvar)	22 (18.33)
rtM204V/I+rtL80V/I	LAM/Ldt (Kompensatuvar)	20 (16.66)
rtM204V/I+rtA181T/V	LAM/Ldt/ADV	5 (4.16)
rtL180M+rtL80V/I	LAM/Ldt (Kompensatuvar)	3 (2.5)
rtL180M+rtA181T/V	LAM/Ldt/ADV (Kompensatuvar)	2 (1.66)
rtA181T/V+rtV173L	LAM/ADV (Kompensatuvar)	1 (0.83)
rtM204V/I+rtV173L	LAM/Ldt (Kompensatuvar)	1 (0.83)
rtL80V/I+rtA181T/V	LAM/ADV (Kompensatuvar)	1 (0.83)
rtM204V/I+ rtL180M+rtL80V/I	LAM/Ldt (Kompensatuvar)	1 (0.83)
rtM204V/I+rtL80V/I+rtA181T/V	LAM/Ldt/ADV (Kompensatuvar)	1 (0.83)
rtM204V/I+ rtL180M+rtN236T	LAM/Ldt/ADV (Kompensatuvar)	1 (0.83)

riyle kaçırılan polimeraz gen bölgesi rtI169 olup, rtL80 mutasyonu ise pirosekanslamada taranmamaktadır.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen hastalarda saptanan RT gen bölgesi mutasyonlarının %51.66'sının tek bölgede, %45.83'ünün iki bölgede ve %2.51'inin ise üç bölgede olduğu görülmüştür. Tek bölge mutasyonları içerisinde %9.16 oranında rtL180M ve rtL80V/I pozisyonlarında kompensatuvar mutasyonlar saptanmıştır. Çoklu baz mutasyonu belirlenen örnekler arasında ise, toplamda %44.13 oranında rtL180M, rtL80V/I ve rtV173L pozisyonlarında kompensatuvar mutasyonlar görülmüştür.

Tek bölge mutasyonları içerisinde en sık RT enziminin 204 no.lu kodonunda görülen ve YMDD mutasyonu olarak adlandırılan rtM204V/I (%34.16) mutasyonu saptanmış olup, bunu izleyen sırasıyla rtL180M (%6.66), rtA181T/V (%5.83), rtL80V/I (%2.5) ve rtN236T (%2.5) mutasyonları belirlenmiştir.

Hastaların 55'inde saptanan iki farklı bölgedeki mutasyonların görülme sıklığı ise; 22 hastada (%18.33) rtL180M+rtM204V/I, 20 hastada (%16.66) rtM204V/I+rtL80V/I, beş hastada (%4.16) rtM204V/I+rtA181T/V, 3 hastada (%2.5) rtL180M+rtL80V/I, iki hastada (%1.66) rtL180M+rtA181T/V ve birer hastada (%0.83) rtA181T/V+rtV173L, rtM204V/I+rtV173L ve rtL80V/I+rtA181T/V şeklindedir.

Üç bölge mutasyonu saptadığımız birer hasta (%0.83) bulunmakta olup, mutasyonların rtL180M+rtM204V/I+rtL80V/I, rtM204V/I+rtL80V/I+rtA181T/V ve rtL180M+rtM204V/I+rtN236T bölgelerinde olduğu görülmüştür. Çalışmamızda belirlenen direnç mutasyonları Tablo 1'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Kronik hepatit B'nin tedavisinde 1985 yılından itibaren interferonlar kullanılmaya başlanmış, daha sonra yeni antiviral ilaçların ortaya çıkmasıyla HBV enfeksiyonunun tedavisinde yeni ve daha başarılı tedavi seçenekleri kullanılabilir hâle gelmiştir[2]. Ancak, NA tedavileri uzun süreli, çoğu kez yaşam boyu devam etmekte ve bu da beraberinde dirençli mutant virüslerin ortaya çıkışına neden olmaktadır. Primer mutasyonlar ilaç direncinden doğrudan sorumludur, kompensatuvar mutasyonlar ise viral replikasyon yetene-

ğinin yine gelişmesine neden olmaktadır. Dirence karşı genetik bariyeri düşük LAM, Ldt ve ADV gibi antivirallere direnç gelişiminde tek bir primer mutasyon yeterli olabilmektedir[9]. Bu nedenle tedaviye uyumlu KHB hastalarında ilk seçenek ilaç olarak tenofovir ve entekavir gibi dirence karşı genetik bariyeri yüksek, oral olarak alınan ve kullanımı kolay, yan etkisi az olan ilaçlar önerilmektedir[2,6]. Tedavi uyumlu hastalarda tedaviye yanıtsızlık durumunda antiviral direnç varlığı araştırılmalıdır. Antiviral direnç tespit edilmesi durumunda ise çoğul ilaca dirençli suşları indükleme riskini en aza indirmek için, çapraz direnç göstermeyen en etkili NA ilaçlar ile uygun bir kurtarma tedavisi başlatılması önerilmektedir[6].

Lamivudin en yüksek direnç oranına sahip antiviral olup, dirence neden olan en yaygın mutasyon HBV polimerazının aktif bölgesindeki YMDD (tirozin, metiyonin, aspartat, aspartat) motifini etkileyen mutasyonlardır. Mutasyonun sonucunda YMDD motifindeki 204. kodon tarafından kodlanan metiyonin yerine valin/izolösin (rtM204V/I, YVDD/YIDD varyantı) gelebilmektedir[9,10]. Çalışmamızda da en sık rtM204V/I mutasyonları görülmüştür. Bu mutasyonların tek başına (%34.16) ve çeşitli kompensatuvar mutasyonlarla (%38.31) veya ADV direncinden sorumlu olan rtA181T/V mutasyonu ile birlikte (%4.16) olduğu belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda, çoklu-baz mutasyonları içerisinde sonuçlarımıza benzer şekilde en sık rtM204V/I+rtL180M birlikteliğinin görüldüğü bildirilmiş ve bu mutasyonların sıklıkla yapısal olarak da birbirine benzer LAM ve Ldt direncine neden olduğu vurgulanmıştır[10,11]. Bu iki pozisyonda görülen mutasyonların sonuçlarımıza benzer şekilde tekli mutasyonlar içerisinde de en sık görülen direnç mutasyonu olduğu bildirilmiştir[11]. Çalışmamızda, toplamda %77 oranında saptanan YMDD mutasyonu, yakın zamanda Saran ve ark.'nın[12] yaptığı çalışmada %83 oranında belirlenmiştir. Çalışmada antiviral tedavi alan 131 KHB hastasında %9.1 oranında mutasyon saptanmış ve YMDD ile birlikte çeşitli kompensatuvar mutasyonlar ve ADV direncinden sorumlu rtN236T mutasyonu bildirilmiştir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, HBV tedavisi alan 45 hastadaki direnç mutasyonları araştırılmış ve hastaların %29'unda ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. Çalışmada, sonuçlarımıza benzer şekilde rtM204V/I mutasyonu tek başına %31 oranında saptanırken, geri kalanına rtL180M ve rtV173L kompensatuvar mutasyonların eşlik ettiği bildirilmiştir[13]. Sıklıkla belirlenen bu rtL180M ve rtV173L gibi sekonder kompensatuvar mutasyonların viral replikasyon kapasitesini arttırdığı bilinmektedir. Özellikle tek bölge primer mutasyon saptanan virüslerle kıyaslandığında, bu tür sekonder kompensatuvar mutasyonların mutant virüslere önemli bir avantaj sağladığı bildirilmektedir[14]. Kırdar ve ark.[15] bir yıl süreyle LAM tedavisi alan 50 KHB hastasında direnç mutasyonlarını araştırdıkları çalışmada, hastaların %24'ünde primer ve kompensatuvar dirençten sorumlu mutasyonlar saptamıştır. Direnç mutasyonu saptadıkları hastaların yarısında tek başına YMDD mutasyonu saptanırken, diğer yarısının ADV direnci ile kompensatuvar mutasyonların birlikte görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmamızda da, hastaların yaklaşık yarısında büyük çoğunluğu LAM ve Ldt ile birlikte veya ADV direnç mutasyonuna eşlik eden kompensatuvar mutasyonlar saptanmıştır.

Nükleotid analoglarından ADV, LAM dirençli varyantlarda etkilidir fakat beş yıllık tedavi sonrasında %30'luk önemli bir direnç oranından söz edilmektedir. Adefovir direncine neden olan başlıca iki mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar HBV polimerazın 236. (rtN236T) ve 181. (rtA181V/T) pozisyonlarındaki aminoasit değişimleriyle sonuçlanan mutasyonlardır[14]. Çalışmamızda, her iki mutasyonun da tespit edildiği görülmüştür. Bazı çalışmalarda, daha önce ADV tedavisi görmeyen hastalarda ADV direncinden sorumlu mutasyonların saptandığı da bildirilmiştir[8,15]. Ancak, ADV tedavisi almamış bu hastalarda görülen tekli rtA181T mutasyonunun ADV yerine yeni bir LAM direnç mutasyonu olarak da düşünülebileceği belirtilmiştir[8]. Aynı şekilde LAM tedavisi almış hastalarda saptanan primer olarak LAM/Ldt direncinden sorumlu rtM204V/I + L180M mutasyonlarının daha önce ETV almamış hastalarda ETV direncine neden

olabileceği vurgulanmıştır[16]. Dolayısıyla LAM tedavi uyumlu olup da tedaviye yanıtsız hastalarda ilk seçenek olarak önerilen ETV kullanımından önce de çapraz direncin sorgulanmasının yararlı olacağı bildirilmektedir[3,5]. Çalışmamız uzun süreli geriye dönük bir tarama çalışması olduğundan ve hastaların tedavi geçmişlerine ulaşılamadığından entekavir tedavisine başlarken nelerin dikkate alındığına dair verilere ulaşılamamıştır.

Dirence karşı genetik bariyeri oldukça yüksek olan entekavir için, LAM dirençli hastalarda daha yüksek oranda direnç gösterdiği saptanmıştır. Çünkü ETV direnci için rtI169T, rtS184G, rtS202G/I veya rtM250V gibi primer olarak ETV direncinden sorumlu mutasyonların yanında bir YMDD motif mutasyonuna gerek duyulduğu belirtilmektedir[17]. Tenofovir direncinden sorumlu tutulan tipik bir mutasyon bildirilmemekle birlikte, TNF tedavisi sırasında gözlenen rtA194T mutasyonunun TNF direnci ile ilişkilendirilebileceği belirtilmektedir[14]. Ancak, ADV ile bazı yapısal benzerlikleri nedeniyle iki ilaç arasında potansiyel bir çapraz direnç söz konusudur. Hem ADV direncine yol açan primer mutasyonlara (rtA181T/V ve/veya rtN236T) sahip mutant virüslerde TNF'nin in vitro olarak daha az etkinlik gösterdiği hem de ADV dirençli hastalarda duyarlı hastalarla kıyaslandığında TNF'nin çok daha az etkili olduğu belirtilmektedir[14,18]. Çalışmamızda, ETV veya TNF ile primer olarak ilişkilendirilmiş herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

Nükleoz(t)id analoglarının uzun süreli ve yaygın olarak kullanılması yıllar içerisinde direnç mutasyonlarında artışa neden olmuştur. Gelişen dirençle birlikte antiviral tedavilerin etkinliği de önemli oranda zayıflamış, hastalığın yönetimi zorlaşmıştır[10]. Nükleoz(t)id analogları viral polimeraz geni tarafından kodlanan RT enzimini hedef aldığı için, RT bölgesinde görülebilecek her türlü mutasyon ilaç direnci ile ilişkili olacaktır[9]. Hazır ticari testler daha önceden iyi belirlenmiş direnç mutasyonlarını saptayabilmekte fakat olası yeni mutasyonlar konusunda fikir vermemektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, LAM tedavisi alan KHB hastalarında direnç mutasyonları dizi analizi ve ticari hibridizasyon yöntemleri ile araştırılmış, yöntemlerin mutasyonları belirlemedeki performansları değerlendirilmiştir[19]. Libbrecht ve ark.[8], bu iki yöntemi karşılaştırdıkları çalışmalarında, dizi analizinin primer ve kompensatuvar direnci belirlemede duyarlılığının daha düşük olduğunu belirtirken, Aydoğan ve ark.[19] her iki yöntemin de genel olarak benzer performans sergilediğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, özellikle tedavi yanıtsızlığı gösteren uyumlu hastalarda, rutin direnç testleri yanında dizi analizi gibi yöntemlerle daha önce tanımlanmamış yeni mutasyonların araştırılması ve buna bağlı olarak tedavi rejimlerinin yeniden planlanması daha yararlı olabilir. Bu amaçla, HBV direnç mutasyonlarının uzun süreli ve kalıcı olarak izlenmesi, tedavi başarısızlığı gibi direnç düşünüldüğü durumlarda daha geniş çaplı olarak mutasyon analizlerinin yapılması ve tedavi rejimlerinin bu mutasyonların varlığına göre sürekli olarak güncellenmesi akılcı bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, Yuen MF. Chronic hepatitis B virus infection. Lancet. 2018;392(10161): 2313-24. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31865-8
2. World Health Organization. Global hepatitis report, 2017. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b]. (Erişim tarihi: 29/01/2019).
3. Türkiye Viral Hepatitler Tanı ve Tedavi Kılavuzu, 2017. [http://www.vhsd.org/tr/page/turkiye-viral-hepatitliler-tani-ve-tedavi-kilavuzu-2-7.html]. (Erişim tarihi: 29/01/2019).
4. Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. World J Gastroenterol. 2016;22(1):145-54. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.145
5. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. Hepatology. 2018;67(4):1560-99. https://doi.org/10.1002/hep.29800
6. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2017;67(2):370-98.

https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021
7. Akhan S, Aynıoğlu A, Çağatay A ve ark. Kronik hepatit B virüsü infeksiyonunun yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu uzlaşı raporu. Klimik Derg. 2014;27(Suppl):S2-18. https://doi.org/10.5152/kd.2014.26
8. Libbrecht E, Doutreloigne J, Van De Velde H, et al. Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic hepatitis B virus-infected patients during long-term lamivudine treatment, assessed by a line probe assay. J Clin Microbiol. 2007;45(12):3935-41. https://doi.org/10.1128/JCM.00020-07
9. Guo X, Wu J, Wei F, et al. Trends in hepatitis B virus resistance to nucleoside/nucleotide analogues in North China from 2009-2016: A retrospective study. Int J Antimicrob Agents. 2018;52(2):201-9. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.002
10. Zhang HY, Liu LG, Ye CY, et al. Evolution of drug-resistant mutations in HBV genomes in patients with treatment failure during the past seven years (2010-2016). Virus Genes. 2018;54(1):41-7. https://doi.org/10.1007/s11262-017-1518-z
11. He X, Wang F, Huang B, Chen P, Zhong L. Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus. Int J Clin Exp Med. 2015;8(6):9630-9.
12. Saran B, Tüzüner U, Feyzioğlu B, Özdemir M, Baykan M. Determination of resistance Mutation in chronic hepatitis B patients using antiviral drugs at our hospital. Viral Hepat J. 2017;23(1):30-3. https://doi.org/10.4274/vhd.38257
13. Timur D, Ökahmetoğlu S, Özüberk O, Sezgin GC, Parkan ÖM, Kaan Ö. Kronik hepatit B için antiviral tedavi alan hastalarda antiviral ilaç direncinin araştırılması. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2017;47(1):1-5. https://doi.org/10.5222/TMCD.2017.001
14. Tacke F, Kroy DC. Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. Ann Transl Med. 2016;4(18):334. https://doi.org/10.21037/atm.2016.09.19
15. Kırdar S, Yaşa MH, Aydın N, Gültekin Korkmazgil B. Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının moleküler yöntem ile belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2016;46:135-40. https://doi.org/10.5222/TMCD.2016.135
16. Sayan M, Hülagü S, Akhan SÇ, Şentürk Ö, Meriç M, Çekmen M. Lamivudin tedavisi uygulanmış ve entekavir naif kronik hepatit B'li hastalarda entekavir ilaç direnci. Mikrobiyol Bul. 2009;43(3):425-32. https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01639.x
17. Zoulim F, Locarnini S. Optimal management of chronic hepatitis B patients with treatment failure and antiviral drug resistance. Liver Int. 2013;33(1):116-24. https://doi.org/10.1111/liv.12069
18. Herbers U, Amini-Bavil-Olyaee S, Mueller A, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Hepatitis B e antigen-suppressing mutations enhance the replication efficiency of adefovir-resistant hepatitis B virus strains. J Viral Hepat. 2013;20(2):141-8. https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01639.x
19. Aydoğan S, Ergünay K, Balaban Y ve ark. Bir yıldan uzun süreli antiviral ilaç kullanan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının saptanması. Mikrobiyol Bul. 2013; 47(3):472-81. https://doi.org/10.5578/mb.5625

Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(1):47-54
doi:10.5222/TMCD.2019.047

Araştırma / *Research Article*

Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

Fabrication of Chlorogenic Acid Loaded PLGA Nanoparticles and Determination of Antimicrobial Activity

Yasemin Budama-Kılınç

Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Tüm dünyada gıda endüstrisinde kullanılan kimyasal koruyucu maddelerin zararlı etkileri konusunda ciddi endişeler söz konusudur. Bu çalışmanın amacı, nutrasötik madde olan klorojenik asit bazlı kontrollü salım sisteminin üretimi ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesidir.*
Yöntem: *Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri çift emülsiyon yöntemi ile sentezlenmiş, Zeta Sizer cihazı ile karakterize edilmiş, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi belirlenmiştir. Ayrıca klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin gıda patojenlerinden olan Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15442), Salmonella Typhimurium (ATCC 14028) ve Listeria monocytogenes (ATCC 10033) üzerindeki antimikrobiyal etkinliği mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir.*
Bulgular: *Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül boyutunun 228.5±27.8 nm, polidispersite indeksinin 0.127, zeta potansiyel değerinin -4.87±4.82 mV olduğu bulunmuştur. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon veriminin %99, yükleme veriminin ise %68 olduğu hesaplanmıştır. Pseudomonas aeruginosa üzerinde 62.5±0.024 µg/mL ve Salmonella Typhimurium üzerinde 62.5±0.111 µg/mL ve Listeria monocytogenes üzerinde 125±0.097 µg/mL konsantrasyonlarında inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.*
Sonuç: *Kontrollü salım özelliği ile klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin Pseudomonas aeruginosa ve Salmonella Typhimurium üzerindeki antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde arttığı, Listeria monocytogenes'de ise daha az etki gösterdiği belirlenmiştir. Üretilen nanopartiküllerin ileriki çalışmalar ile gıda alanında koruyucu olarak kullanım potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Klorojenik asit, nanopartikül, antimikrobiyal*

ABSTRACT

Objective: *There are serious concerns about the harmful effects of chemical preservatives used in the food industry all over the world. The aim of this study is to determine the antimicrobial activity of controlled release system based on chlorogenic acid as a nutraceutical agent.*
Method: *Chlorogenic acid-loaded PLGA nanoparticles were synthesized by double emulsion method and characterized by Zeta Sizer device. The encapsulation efficiency and loading capacity were determined. In addition, antimicrobial activity of chlorogenic acid-loaded PLGA nanoparticles on food pathogens Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15442), Salmonella Typhimurium (ATCC 14028) and Listeria monocytogenes (ATCC 10033) was investigated by microdilution method.*
Results: *PLGA nanoparticles with chlorogenic acid loaded was found an average particle size of 228.5±27.8 nm, a polydispersity index of 0.127, and a zeta potential of -4.87±4.82 mV. It was calculated that the encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles loaded with chlorogenic acid was 99% and the loading efficiency was 68%. Pseudomonas aeruginosa on 62.5±0.024 µg/mL and Salmonella Typhimurium on 62.5±0.111 µg/mL, and Listeria monocytogenes 125±0.097 µg/mL concentrations were found to show inhibitory effect.*
Conclusion: *It was determined that the antimicrobial effect of the chlorogenic acid-loaded PLGA nanoparticles on the Pseudomonas aeruginosa and Salmonella Typhimurium increased significantly and the results showed less antimicrobial effect on Listeria monocytogenes. It is thought that the produced nanoparticles may have the potential to be used as a preservative in the field of food with further studies.*

Keywords: *Chlorogenic acid, nanoparticle, antimicrobial*

Alındığı tarih:
02.02.2019
Kabul tarihi:
27.02.2019
Ç. içi yayın tarihi:
25.03.2019

ORCİD Kayıtları

Y. Budama-Kılınç 0000-0003-0601-3091

✉ yaseminbudama@gmail.com

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Günümüzde hâlen dünya çapında gıdaların mikrobiyolojik güvenliği; tüketiciler, denetleme kurumları ve gıda endüstrisi için sorun olmaya devam etmektedir[1]. Gıda endüstrisinde kimyasal koruyucu kullanmanın kanserojenik etkileri hakkında artan endişe, doğal ve bitkisel maddelere olan ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır[2,3]. Her ne kadar sentetik antimikrobiyaller birçok ülkede onaylanmış olsa da son eğilim; alternatif, güvenli, etkili ve kabul edilebilir doğal koruyucuların kullanımı olmuştur[1]. Böylece, gıda ürünlerinde sentetik kimyasal koruyucuların kullanılması yerine, tüketici tarafından kabul edilebilir doğal antimikrobiyallerin tanımlanması değerli hâle gelmiştir[4]. Birçok bitki ekstraktı, bir dizi bakteri, maya ve küfe karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Özellikle fenolik asitler son zamanlarda, anti-enflamatuvar ve antioksidan özellikleriyle ilgili umut vermektedir[2,5,6].

Klorojenik asit; elma, armut, kakao, kahve, turunçgiller gibi bazı bitki türlerinde bulunan önemli fenolik bileşiklerden biridir[4,7]. Anti-bakteriyel, antioksidan, antiviral, anti-diyabetik ve anti-kanserojen özellikleri klorojenik asitin birçok hastalığın tedavisinde nutrasötik ajan olarak kullanımını ön plana çıkartmıştır[8,9]. Tüm bunların yanı sıra klorojenik asitin bakteri, maya, küf, virüs ve amipler de dâhil olmak üzere çok çeşitli organizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermesi gıda katkı maddesi olarak da kullanım avantajı sağlamaktadır[4].

Literatürde bazı çalışmalarda, klorojenik asidin, gıda ürünlerinin korunmasında yararlı antimikrobiyal madde olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir[4]. Ancak, literatürde şu ana kadar klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri ile bir çalışma yapılmamıştır.

Günümüzde nanoteknoloji birçok alanda kullanılmakla birlikte, gıda endüstrisinde kullanımı hızla büyümektedir. Nanoenkapsülasyon yöntemleri kullanılarak kararsız olan antimikrobiyallerin korunması, gıdaların kalitelerinin ve güvenliklerinin arttırılması söz konusu olmaktadır[10-13]. Ayrıca enkapsülasyon ile gıda katkı maddesinin stabilitesi arttırılabilir ve antimikrobiyal aktivite kaybı da önlenebilmektedir[14]. Enkapsülasyon için kitosan gibi biyopolimerler kullanılabilmesinin yanı sıra PLGA gibi FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından onaylı polimerler de tercih edilmektedir[15].

Bu çalışmada, gıda teknolojilerinde kullanılması amacıyla, alternatif bir yaklaşım olarak klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi belirlenmiştir. Ayrıca klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin gıda patojenlerinden olan *Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* Typhimurium ve *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği, klorojenik asit ve boş PLGA nanopartikülleri ile kıyaslı bir şekilde test edilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klorojenik asit (Mw~354 g/mol) Thermo Fisher'dan (ABD), poli(D,L-laktik-ko-glikolik) asid (PLGA) (50:50, Mw~38-54 kDa), diklorometan (DCM) ve polivinil alkol (PVA) Sigma-Aldrich'den (ABD) satın alınmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar ve solventler analitik saflıktadır. Ultra saf su Millipore MilliQ Gradient sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküller literatürde ayrıntılı şekilde belirtilen ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (su/yağ/su, w/o/w) kullanılarak üretilmiştir[16,17]. Nanopartiküllerin üretimi için 100 mg PLGA, 6 mL diklorometan içerisinde çözdürülmüştür. 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanan klorojenik asit çözeltisiden önceden hazırlanan PLGA çözeltisinin üzerine 2 mL eklenmiştir ve 3 dk. boyunca 70 W enerji altında sonikasyon uygulanarak homojenize edilmiş ve emülsiyon (w/o) oluşturulmuştur. %5'lik PVA distile suda çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen PLGA klorojenik asit emülsiyonu %5'lik PVA çözeltisine çok küçük damlalar hâlinde homojen bir şekilde eklen-

miştir. Bu işlem sonrasında karışım 5 dk. boyunca 70 W enerji altında yine sonikasyon uygulanarak homojenize edilmiş ve ikili emülsiyon (w/o/w) oluşturulmuştur. Elde edilen nanopartiküllerden solventin uzaklaştırılması için 16 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılmıştır. Ertesi gün nanopartiküller üç kez safsızlıkların uzaklaştırılması için 10.000 rpm 45 dk. santrifüj edilerek nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen nanopartiküller 1:200 oranında sulandırıldıktan sonra 0.45 µm'lik rejenere selüloz filtreden geçirilmiş ve karakterizasyon işlemleri için hazır hâle getirilmiştir.

Boş PLGA nanopartikülleri ise içerisine klorojenik asit çözeltisi eklenmeden aynı basamaklardan geçirilerek hazırlanmıştır.

Klorojenik Asitin Standart Eğrisinin Hazırlanması

Klorojenik asit suda (~70°C) çözündürülerek (0.195313; 0.390625; 0.78125; 1.5625; 3.125; 6.25; 12.5; 25 µg/mL) için 8 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. UV-Vis spektrometre yardımı ile her bir konsantrasyonun UV absorbans değeri (324 nm'de) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan konsantrasyona karşılık absorbans grafiği çizilmiştir (Şekil 3). Enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesinin belirlenmesi için eğrinin denklemi elde edilmiştir.

Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Enkapsülasyon verimini belirlemek için, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin santrifüj aşamasından sonra süpernatant alınmıştır ve içerisindeki serbest klorojenik asit miktarı UV-Vis spektrometreden elde absorbans değeri klorojenik asitin standart eğrisinden elde edilen doğru denklemine yazılarak hesaplanmıştır. UV-Vis ölçümünde boş PLGA nanopartikülleri kör olarak kullanılmıştır. Enkapsülasyon verimi Denklem 1 kullanılarak hesaplanmıştır. Klorojenik asit PLGA nanopartikülleri için yükleme kapasitesi ise Denklem 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

Denklem 1.

$$\text{\% Enkapsülasyon Verimi} = \frac{\text{PLGA Nanopartiküllerindeki Klorojenik Asit Miktarı - Serbest Klorojenik Asit Miktarı}}{\text{PLGA Nanopartiküllerindeki Klorojenik Asit Miktarı}} \times 100$$

Denklem 2.

$$\text{\% Yükleme Kapasitesi} = \frac{\text{Enkapsüle Edilmiş Klorojenik Asit Miktarı}}{\text{Toplam Nanopartikül Ağırlığı}} \times 100$$

Dinamik Işık Saçılması ve Zeta Potansiyel Analizi

Üretilen nanopartiküllerin zeta potansiyel, polidispersite indeks ve boyut ölçümü için Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Partiküller ölçüm yapmak için transparan küvete konulmuştur ve 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) ile 25^{o}C'de ölçüm alınmıştır. Her bir örnek fosfat tamponu ile hazırlanmıştır ve ölçümden önce 0.45 µm'lik rejenere selüloz membrandan filtre edilmiştir. Partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi 10 ölçümün ortalaması alınarak raporlanmıştır.

Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin İn Vitro Salım Profili

Klorojenik asitin in vitro salım profilini belirlemek için klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri distile suda disperse edilerek diyaliz kapsülüne yerleştirilmiştir. Salım ortamı olarak fosfat tamponu (PBS) (pH=7.2) kullanılmıştır. Örnekler 100 rpm'de yatay çalkalamalı su banyosunda 37°C'de inkübe edilmiştir. Klorojenik asitin in vitro salım profili 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saatlik zaman aralıkları ile belirlenmiştir. Salım ortamından 1 mL örnek alınmıştır ve yerine ise aynı hacimde taze salım ortamı eklenmiştir. Alınan örnekler UV-Vis spektrometre ile analiz edilerek, zamana bağlı olarak nanopartikülden salınan klorojenik asit miktarı standart eğri yardımı ile Denklem 3 kullanılarak elde edilmiştir.

Denklem 3.

$$\text{Salım (\%)} = \frac{\text{Salınan Klorojenik Asit Miktarı}}{\text{Toplam Klorojenik Asit Miktarı}} \times 100$$

Bakteriyel Suşlar ve Büyüme Koşulları

Antimikrobiyal testler Nanomik Biyoteknoloji A.Ş. laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmalar [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 10033)], ticari olarak firma tarafından sağlanmıştır. Bakteri suşları, Luria-Bertani (LB) besiyerinde (Miller, Merck 1102850500)

37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmaların iyi bir şekilde büyümesine izin verdiği için LB besiyeri deneyler için yeğlenmiştir[18].

Antibakteriyel Etkinlik Testleri ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Örneklerin belirtilen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivite ve MİK değerleri, bazı modifikasyonlar ile mikrodilüsyon yöntemi ile 96'lık mikroplak kullanılarak gerçekleştirilmiştir[19]. Örnekler LB broth ile seyreltilmiştir ve 62.5; 125; 250; 500 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda mikroplaka kuyucuklarına eklenmiştir. Test edilen mikroorganizmaların son konsantrasyonları 0.5 Mc Farland ($1.5x10^8$ CFU/mL) standartları mikroplaka kuyucuklarına eklenmiştir ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon öncesinde ve sonrasında mikroplakanın absorbans değeri 600 nm dalga boyunda spektrometre (Biotek-Epoch 2, ABD) ile ölçülmüştür. Kullanılan örneklerin test edilen mikroorganizmaların üzerinde büyümesini inhibe eden en düşük konsantrasyonu MİK olarak tanımlanmıştır.

İstatistik Analiz

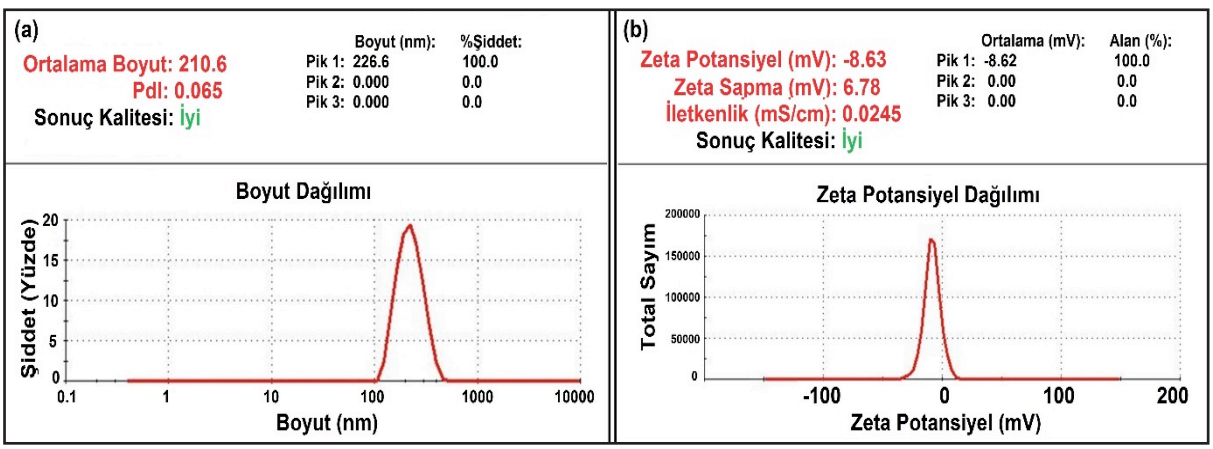
Muameleler ve antimikrobiyal etkiler arasındaki farklılıkları ortaya koyan verilere tek faktörlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Varyans analizlerinin uygulanmasında Minitab (Ver. 2001) ve Duncan çoklu karşılaştırma analizlerinde de MSTAT-C (Ver. 1979) paket programlarından yararlanılmıştır.

BULGULAR

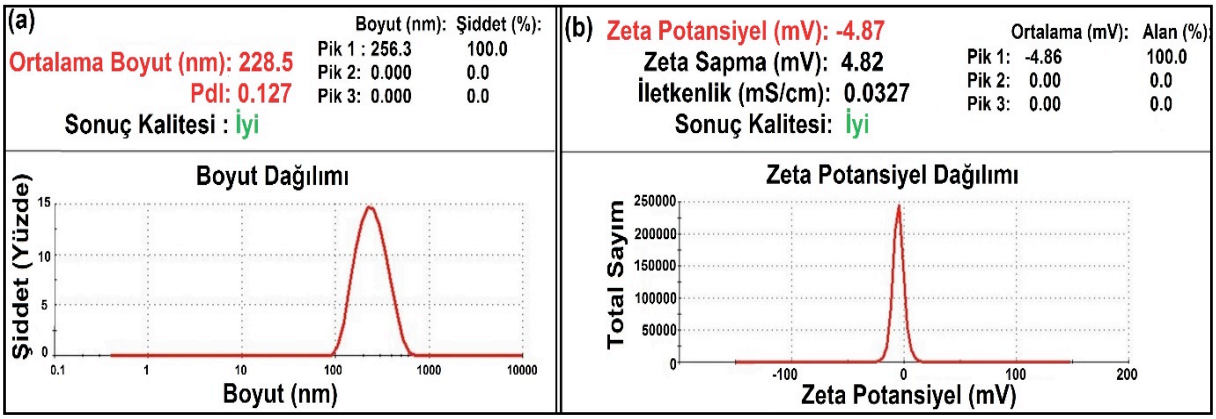
Dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi sıvı içerisindeki nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımlarını in situ değerlendirmeye olanak tanıyan en kullanışlı deneysel tekniklerden biridir. Bu çalışmada, çift emülsiyon (w/o/w) yöntemi ile üretilen klorojenik asit yüklü PLGA ve boş PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel, partikül boyutu ve polidispersite indeksi analizleri Zeta Sizer cihazı ile yapılmıştır.

Şekil 1'de boş PLGA nanopartiküllerine ait boyut ve zeta potansiyel sonuçları görülmektedir. Boş PLGA nanopartikülleri, 210.6±16 nm'lik ortalama partikül boyutu ve 0.065'lik polidispersite indeksi değerleri ile dar bir boyut dağılımına sahiptir (Şekil 1a). Şekil 1b'de ise boş PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel değerinin -8.63±6.78 mV olduğu görülmektedir.

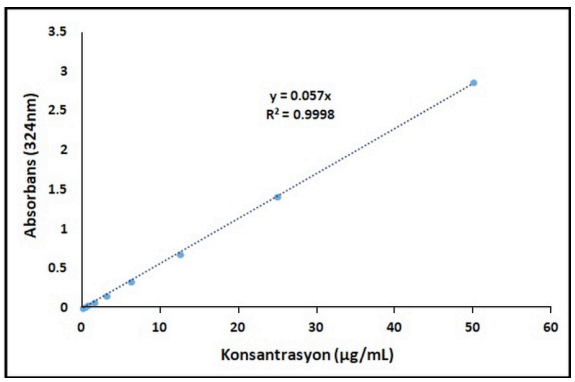
Şekil 2'de ise klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerine ait zeta sizer cihazı sonuçları verilmektedir. Şekil 2a'da da görüldüğü üzere, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül boyutu 228.5±27.8 nm ve polidispersite indeksinin ise 0.127 olduğu bulunmuştur. Şekil 2b'de ise klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerinin -4.87±4.82 mV olarak ölçüldüğü görülmektedir. Üretilen nanopartiküllerin zeta sizer cihazı ile parti-



Şekil 1. Boş PLGA nanopartiküllerinin Zeta Sizer sonuçları (a) ortalama partikül boyutu, (b) zeta potansiyel.



Şekil 2. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin Zeta Sizer sonuçları. (a) ortalama partikül boyutu, (b) zeta potansiyel.



Şekil 3. Klorojenik asitin standart eğrisi.

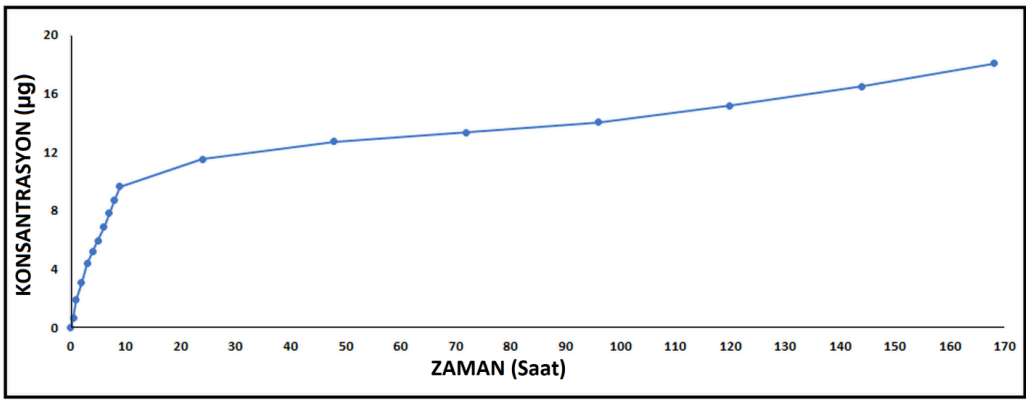
kül oluşumu karakterize edildikten sonra, klorojenik asit PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi belirlenmesi için klorojenik asitin standart eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 3). Bunun için UV-Vis spektrometre ile 324 nm'de klorojenik asitin 8 farklı konsantrasyondaki çözeltisi için absorbans değerleri belirlenmiştir. Klorojenik asitin her bir konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değeri için grafik çizilmiştir ve doğru denklemi bulunmuştur.

Klorojenik asitin enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesini hesaplamak için standart eğri kullanılmıştır. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri üretilirken santrifüj aşamasında süpernatanttaki klorojenik asit konsantrasyonu belirlenmiştir ve Denklem 1 yardımıyla enkapsülasyon verimi % 99 olarak hesaplanmıştır. Klorojenik asitin yükleme verimi ise Denklem 2 kullanılarak %68 olarak hesaplanmıştır. Bu değerin anlamı, her 1 mg klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri 0.68 mg klorojenik asit içerdiğini göstermektedir. Enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi değerleri klorojenik asitin enkapsüle edildiğini ve klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermektedir.

Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro salım sonuçları, Şekil 4'te verilmiştir. İn vitro kontrollü salım sonuçlarına göre 24 saat içerisinde, klorojenik asitin 12 µg/mL serbest bırakıldığı ve klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin ilerleyen 7 gün içinde yavaş bir serbest bırakma profili gösterdiği bulunmuştur.

Klorojenik asit, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülü ve boş PLGA nanopartiküllerinin Tablo 1'de belirtilen gıdalar patojenlerinden olan üç farklı bakteri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve MİK değerleri belirlenmiştir.

Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin yükleme verimi hesabı doğrultusunda 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri (62.5; 125; 250; 500 µg/mL) içerisindeki klorojenik asit miktarı sırasıyla 42.5; 85; 170 ve 340 µg olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada, aynı miktarda örnek hacmi kullanılmasına karşın, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin az miktarda klorojenik asit içerdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro salım profili.

Tablo 1. Klorojenik asit, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülü ve boş PLGA nanopartikülünün bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri. Tablodaki sayılar üç tekrarlı deneyler sonucu elde edilen ortalama ± standart sapma (SD) değerleridir.

	MİK (µg/mL)		
Bakteri	**Boş PLGA Nanopartikülü[τ]**	**Klorojenik Asit**	**Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartikülü**
Pseudomonas aeruginosa	>500±0.106	62.5±0.01^{A,a}	62.5±0.024^{A,b}
Salmonella Typhimurium	>500±0.085	62.5±0.01^{A,a}	62.5±0.111^{A,b}
Listeria monocytogenes	>500±0.106	62.5±0.01^{B,a}	125±0.097^{A,a}

$^{A-B}$ Aynı satırdaki farklı harfler, muameleler arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunduğunu göstermektedir.
$^{a-b}$ Aynı sütundaki farklı harfler, patojenler üzerine antimikrobiyal etkiler arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunduğunu göstermektedir.
^{τ} Boş PLGA nanopartikül muamelesi, istatistiksel analize dâhil edilmemiştir.

Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin antimikrobiyal etkisi, tek başına klorojenik asitin antimikrobiyal etkisi ile kıyaslandığında, kontrollü salım özelliği ile nanopartikülerin istatistiksel olarak antimikrobiyal etkiyi arttırdığı belirlenmiştir. Ancak bu antimikrobiyal etki *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella* Typhimurium'a kıyasla *Listeria monocytogenes*'de daha az gözlenmiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

Gıdalardaki mikrobiyal bozulmaların kontrolü için geleneksel olarak birçok gıda koruma stratejisi kullanılmaktır. Ancak, yiyeceklerin mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonu hâlen yeterince kontrol altına alınamayan bir sorun olmasının yanı sıra bu sorunu çözmek için kullanılan gıda katkı maddelerinin insan sağlığına negatif etkileri de otoriteler tarafından tartışma konusudur.

Literatürde bitkilerden elde edilen doğal ürünler için MİK değeri <100 µg/mL ise oldukça iyi inhibitör etkisinin olduğu, eğer MİK değeri 100 ila 500 µg/mL arasında ise orta dereceli inhibitör etkisinin olduğu ve MİK değeri >1.000 µg/mL ise inhibitör etkisinin olmadığı şeklinde belirtilmiştir[20,21]. Tablo 1'deki klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin MİK değerleri incelendiğinde, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella* Typhimurium için <100 µg/mL olduğundan iyi bir inhibitör etkiye sahip olduğu, ancak *Listeria monocytogenes* için orta dereceli inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir[20,21].

Klorojenik asitin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Salmonella* Typhimurium üzerindeki MİK değerinin 0.04 mg/mL olduğunu[22], *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki $MİK_{80}$ değerinin ise 10 mg/mL olduğunu[23], *Listeria monocytogenes* üzerindeki $MİK_{90}$ değerinin ise 3.54 mg/mL[24] olduğunu gösterilmiştir. Literatürdeki tüm bu değerler, bu

çalışmada elde edilen değerler ile kıyaslandığında, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin (62.5; 125; 250; 500 µg/mL'sinin) içerisinde sırasıyla 42.5; 85; 170 ve 340 µg klorojenik asit bulunduğundan, daha az miktarda etken madde kullanılarak üretilen nanopartiküllerin daha etkin antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, anti-bakteriyel, antioksidan, antiviral, anti-diyabetik ve anti kanserojen özelliğe sahip klorojenik asit kullanılarak, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri üretilmiş ve bu nanopartiküllerin karakterizasyon çalışması yapılmıştır. İn vitro salım profili belirlenmiştir ve bu nanopartiküllerin gıdalarda mikrobiyal bozulmaya neden olan üç farklı bakteri üzerindeki antimikrobiyal etkinliği klorojenik asit ve boş PLGA nanopartikülleri ile kıyaslı bir şekilde incelenmiştir. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin gıda alanında koruyucu olarak kullanım potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir. Ancak ürün olarak klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin etkin olarak kullanılabilmesi için gıdalardaki penetrasyon, renk ve tat değişikliği, alerjik etkilerin değerlendirilmesi ve mikrobiyota deneyleri gibi önem gösteren çalışmaların da gerçekleştirilmesi ileriki çalışmalarda planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol. 2012;156(1):7-17. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006
2. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. Biomed Pharmacother. 2018;97:67-74. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064
3. Ekici K, Alişarlı M, Sancak YC. Peynir çeşitlerinde nitrit ve nitrozaminler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;19(2):71-2.
4. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. Molecules. 2017;22(3):E358. https://doi.org/10.3390/molecules22030358
5. Venditti A, Maggi F, Vittori S, et al. Antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities of *Achillea tenorii.* Pharm Biol. 2015;53(10):1505-10. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.991833
6. Yun N, Kang J-W, Lee S-M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. J Nutr Biochem. 2012;23(10):1249-55. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.018
7. Gil M, Wianowska D. Chlorogenic acids-their properties, occurrence and analysis. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, sectio AA-Chemia. 2017;72(1):61.
8. Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF-κB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. J Biol Chem. 2005;280(30):27888-95. https://doi.org/10.1074/jbc.M503347200
9. Zhong C, Wall NR, Zu Y, Sui G. Therapeutic application of natural medicine monomers in cancer treatment. Curr Med Chem. 2017;24(34):3681-97. https://doi.org/10.2174/0929867324666170714101503
10. Weiss J, Gibis M. Nano-technology in the food industry. Ernaehrungs Umschau International. 2013;60(4):44-51.
11. Donsì F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT-Food Sci Technol. 2011;44(9):1908-14. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003
12. Sanguansri P, Augustin MA. Nanoscale materials development–a food industry perspective. Trend Food Sci Tech. 2006;17(10):547-56. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010
13. Sekhon BS. Food nanotechnology – an overview. Nanotechnol Sci Appl. 2010;3:1-15.
14. Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. Encapsulation in the food industry: a review. Int J Food Sci Nutr. 1999;50(3):213-24. https://doi.org/10.1080/096374899101256
15. Blanco-Padilla A, Soto KM, Hernández Iturriaga M, Mendoza S. Food antimicrobials nanocarriers. Scientific World Journal. 2014;2014:837215. https://doi.org/10.1155/2014/837215
16. Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R, Kecel-Gunduz S, et al. Novel NAC-loaded poly (lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for cataract treatment: preparation, characterization, evaluation of structure, cytotoxicity, and molecular docking studies. PeerJ. 2018;6:e4270. https://doi.org/10.7717/peerj.4270
17. Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R, Horzum-Bayir O. The cytotoxicity, characteristics, and optimization of insulin loaded nanoparticles. Orbital: Electron J Chem. 2017;9(1). https://doi.org/10.17807/orbital.v9i1.934

18. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standarts. M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. 2nd Ed. Wayne, PA, ABD: 2002.
19. Zgoda JR, Porter JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. Pharm Biol. 2001;39(3):221-5. https://doi.org/10.1076/phbi.39.3.221.5934
20. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(7):1027-31. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017
21. de Almeida WS, de Lima SG, Barreto HM, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae). Ind Crops Prod. 2018;125:236-40. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.007
22. Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. J Food Sci. 2011;76(6):M398-M403. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02213.x
23. Bajko E, Kalinowska M, Borowski P, Siergiejczyk L, Lewandowski W. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. LWT-Food Sci Technol. 2016;65:471-9. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.024
24. Muthuswamy S, Rupasinghe HV. Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. J Food Agric Environ. 2007;5(3/4):81.

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. Tüm yazarların ORCID numaraları başvuru esnasında on-line olarak ilgili alana eklenmelidir. ORCID ID kaydı için **https://orcid.org** adresini kullanınız. Ayrıca, yazının tüm yazarlar tarafından onaylandığını ve daha önce hiçbir yerde yayımlanmadığını ve teklif hakkının dergiye bırakılacağını belirten ve tüm yazarlar tarafından imzalanmış web sayfasındaki belgenin (Copyright-Telif) on-line olarak 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 adları ve MİK veya PFGE gibi kısaltmalar ilk kullanıldıklarında tam olarak, açık şekilleriyle yazılmalı mikroorganizma adı daha sonraki kullanımlarda cins adının ilk harfi kullanılarak kısaltılmalıdır. *Staphylococcus aureus S. aureus* gibi. Paragraf başında ise bu kısaltma kullanılmamalı, isim tam olarak yazılmalıdır.
- *Escherichia coli* ve *Entamoeba coli* gibi, kısaltmaları aynı olacak adlar aynı yazıda geçtiğinde yazı boyunca kısaltılmadan kullanılmalıdır. Stafilokok, streptokok gibi sadece cins adı geçen cümlelerde dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir.
- Yanında birim gösterilmeyen ondan küçük sayılar yazı ile yazılmalı, rakam ile yazılan sayılara takılar kesme işareti ile eklenmelidir. Üç hasta suşların 28'i gibi. Mümkün olduğunca cümlelere sayılarla başlanmamalıdır.
- Boyama yöntemi olan Gram büyük harfle yazılmalıdır. Bakteri tanımlamasında ise küçük harf kullanılmalıdır. Örneğin gram negatif kok yazılmalıdır. Negatif / pozitif kelimeleri açık olarak yazılmalı; (-) veya (+) kısaltmaları kullanılmamalıdır.

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

Örnekler

A. Makaleler

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

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

B. Kitaplar

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

C. Sanal Ortam

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